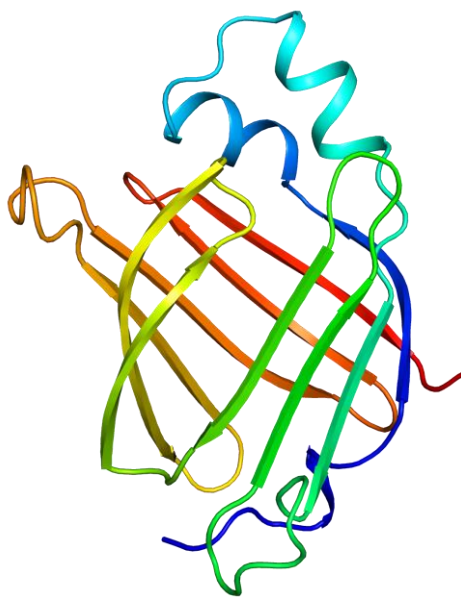




Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

Estudio estructural y biofísico de As-p18, una proteína de
unión a lípidos novedosa, perteneciente al grupo de las
FABP de nematodos



Marina Ibáñez

Director:
Dra. Betina Córscico

Co-Director:
Dr. Brian O. Smith

2014
.....

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), bajo la dirección de la Dra. Betina Córscico; y en dos estadías por un total de nueve meses en la Universidad de Glasgow, Escocia; bajo la dirección del Dr. Brian O. Smith.

Se recibió apoyo económico de la organización no gubernamental Wellcome Trust, Reino Unido, a través de un subsidio en colaboración con el grupo de la Universidad de Glasgow. De la Wellcome Trust y del CONICET, a través de becas doctorales de tipo I y tipo II, respectivamente. Del Ministerio de Educación de la Nación a través de una beca para docentes universitarios doctorandos. De la Fundación Boehringer Ingelheim Fonds, mediante una beca para viaje y estadía en el laboratorio del Dr. Smith en la Universidad de Glasgow.

A Santiago

Tabla de contenidos

Lista de Tablas.....	11
Lista de Figuras.....	12
Agradecimientos.....	17
Abreviaturas/Acrónimos/Definiciones.....	19
Anglicismos.....	23
Publicaciones.....	25
Resumen.....	27
 1. Introducción	 29
1. Áscaris y Geohelminthiasis.....	32
Ciclo Biológico.....	34
Fisiología de Áscaris.....	35
Huevo de Áscaris.....	36
2. Proteínas que Unen Lípidos (LBPs).....	41
3. nemFABPs.....	45
4. As-p18.....	49
5. Objetivos y Organización de la Tesis.....	50
6. Bibliografía.....	51
 2. Fundamentos Teóricos	 57
1. Introducción.....	59
2. Restricciones de Distancia a partir de NOEs.....	62
3. Acoplamiento Dipolares Residuales.....	62
4. De la Relajación a la Dinámica.....	64
5. Formalismo <i>Model Free</i>	67
6. Bibliografía.....	70
 3. Obtención de As-p18	 73
1. Introducción.....	75
2. Materiales y Métodos.....	75
Técnicas de Biología Molecular.....	75

Minipreparación de Plásmidos.....	75
Electroforesis en Geles de Agarosa.....	76
Precipitación con Etanol.....	77
Digestión con Enzimas de Restricción.....	77
Obtención de Bacterias Competentes.....	77
Transformación de Bacterias Competentes.....	77
Plásmidos.....	78
Cultivo Bacteriano y Expresión de Proteína.....	78
Medios.....	79
Expresión de As-p18 para Estudios de RMN.....	79
Expresión de As-p18 No Marcada para Demás Estudios.....	79
Purificación, Cuantificación y Caracterización de Proteína.....	80
Soluciones Amortiguadoras.....	80
Lisis por Sonicación.....	80
Cromatografía de Afinidad en Columna de Níquel.....	80
Cromatografía de Exclusión Molecular.....	81
Cromatografía en Fase Reversa (RP-HPLC).....	81
Medida de ^{14}C	81
Liofilización.....	82
Cuantificación.....	82
Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida en	
Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras.....	82
Espectros de 1D ^1H de As-p18.....	83
3. Resultados.....	83
Biología Molecular.....	83
Purificación.....	85
Cromatografía de Afinidad.....	86
Cromatografía de Exclusión Molecular.....	87
Cromatografía en Fase Reversa (RP-HPLC).....	88
RP-HPLC para el Reciclaje de Muestras de As-p18 con Doble Marca	
Isotópica.....	90
Controles Estructurales por <i>Light Scattering</i>	91
Controles Estructurales por ^1H RMN.....	92

4. Conclusiones y Perspectivas.....	93
5. Bibliografía.....	95

4. Estructura de As-p18 por RMN **97**

1. Introducción.....	99
2. Preparación de Muestras.....	99
3. Adquisición de Espectros.....	100
4. Procesamiento de Datos de RMN.....	100
Procesamiento de Espectros por Transformada de Fourier Directa.....	100
Muestreo Reducido No-Uniforme (Aleatorio).....	100
Métodos Alternativos a la Transformada de Fourier Directa.....	101
5. Asignación Específica de Resonancias.....	103
Asignación Secuencial del Esqueleto Aminoacídico.....	103
Asignación de Cadenas Laterales.....	106
Asignación de Cadenas Laterales Alifáticas.....	106
Asignación de Cadenas Laterales Aromáticas.....	108
Asignación de Cε/Hε de Metioninas y Nε/Hε de Argininas.....	108
Resumen de Asignación Proteica.....	109
Predicción de Estructura Secundaria.....	111
Incorporación de Ligando al Programa <i>CCPNMR Analysis</i>	111
Asignación de Ligando.....	112
6. Restricciones Para el Cálculo de Estructuras.....	114
Restricciones NOE.....	115
Restricciones de Ángulos Diedros.....	117
7. Restricciones Para el Refinamiento de Estructuras.....	117
Restricciones RDC.....	118
Restricciones de Puente de Hidrógeno.....	120
8. Restricciones Proteína-Ligando.....	122
9. Cálculo de Estructuras.....	123
Dinámica Molecular Restringida con Enfriamiento Lento.....	123
Intercambio Proquiral.....	124
Restricciones Ambiguas.....	124
Cálculo Iterativo.....	125

Inclusión de la Molécula del Ligando en el Proceso de Cálculo.....	126
Análisis de Restricciones.....	127
10. Validación de la Estructura.....	128
Selección de Estructuras o <i>Ensemble</i>	128
Ajuste del <i>Ensemble</i> de As-p18 a las Restricciones Experimentales.....	129
Calidad Geométrica del <i>Ensemble</i> de As-p18.....	132
11. Conclusiones.....	135
12. Bibliografía.....	136

5. Estudios de Dinámica de As-p18 **139**

1. Introducción.....	141
2. Medida de T ₁ , T ₂ y NOE heteronuclear.....	141
Experimentos.....	141
Procesamiento y Análisis de Datos.....	142
Resultados.....	143
3. Estimación del Tiempo de Correlación Global y Tensor de Difusión Rotacional....	144
4. Análisis <i>Model Free</i>	146
5. Accesibilidad del Disolvente.....	150
6. Comparación con apo As-p18.....	151
7. Conclusiones.....	152
8. Bibliografía.....	154

6. Análisis de Estructura de As-p18 **157**

1. Introducción.....	159
2. Descripción General.....	159
Topología.....	159
Estructura Tridimensional.....	160
Cavidad Interna.....	161
Posición del Ligando.....	165
Interacciones Ligando:Proteína.....	167
Superficie de As-p18.....	168
<i>Loops</i>	171
Residuos Hidrofóbicos Expuestos en Superficie.....	172

3. As-p18: Punto de Partida para Elucidar Otras nemFABPs.....	173
4. Conclusiones.....	175
5. Bibliografía.....	176

7. Estudios de Interacción con Ligandos **181**

1. Introducción.....	183
2. Estudios de Unión a Lípidos Mediante Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía Gaseosa.....	183
Extracción Lipídica de As-p18.....	183
Análisis de Lípidos por TLC.....	184
Identificación de Ácidos Grasos mediante Cromatografía Gaseosa a partir de los Ésteres Metílicos Correspondientes.....	185
3. Estudios de Preferencia de Unión mediante Espectroscopía de Fluorescencia.....	188
4. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	190
5. Estudios de Interacción mediante RMN.....	194
6. Estudios Preliminares de Transferencia de Ligandos a Membranas Modelos.....	199
Cálculo de la Constante de Afinidad.....	200
Cálculo del Coeficiente de Partición.....	202
Cálculo de la Velocidad de Transferencia.....	204
7. Discusión y Conclusiones.....	207
8. Bibliografía.....	210

8. Conclusiones Generales y Perspectivas **213**

1. Discusión y Conclusiones Generales.....	215
2. Perspectivas.....	218
3. Bibliografía.....	219

9. Apéndices **221**

A. Asignación de las Resonancias de ^1H , ^{15}N y ^{13}C de holoAs-p18.....	223
B. Asignación de las Resonancias de OLA.....	230
C. Introducción de la Molécula del Ligando OLA al Cálculo.....	231
Archivo de Topología para la Molécula de OLA.....	231
Restricciones No Ambiguas OLA:As-p18.....	235

D. Intensidad de Picos NH en Espectros ^{15}N -HSQC para As-p18 en sus Formas Apo y Holo.....	236
E. Análisis del <i>Ensemble</i> de As-p18 por <i>PROCHECK-NMR</i>	238
Gráficos de Ramachandran (20 modelos).....	238
Distribución de Frecuencia Chi-1 (20 modelos).....	246
Propiedades por Residuo (20 modelos).....	250
F. Parámetros Optimizados de acuerdo a <i>ModelFree</i> para el Análisis de la Dinámica del <i>Backbone</i>	253
G. Efecto de la Inclusión de Restricciones RDC y Puente de Hidrógeno en el Refinamiento de la Estructura de As-p18.....	255
H. Preparación y Cuantificación de SUVs.....	256
I. Ov-FAB-1. Biología Molecular y Puesta a Punto de la Purificación.....	257
J. Bm-FABP. Biología Molecular, Purificación y Estudios Preliminares de NMR.....	261
K. Secuencias de Proteínas Empleadas en el Alineamiento Múltiple por <i>MUSCLE</i> ...	263

Lista de Tablas

Tabla 1.1- iLBPs de mamíferos.....	42
Tabla 4.1- Resumen de asignación de As-p18 para los residuos 1-143.....	109
Tabla 4.2- Resonancias con valores de corrimiento químico atípicos en As-p18.....	110
Tabla 4.3- Resumen de las condiciones de alineación testeadas para obtener RDCs...	120
Tabla 4.4- Residuos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno.....	122
Tabla 4.5- Resumen de las condiciones de la Dinámica Molecular Restringida con Enfriamiento Lento.....	124
Tabla 4.6- Protocolo iterativo para el cálculo estructural de As-p18 en <i>ARIA</i>	126
Tabla 4.7- Estadísticas de las restricciones experimentales.....	129
Tabla 4.8- RMSD calculado con el software <i>UWMN</i> para la proteína completa sin <i>tag</i> y para las regiones estructuradas	131
Tabla 4.9- Resumen de las desviaciones del ensemble de As-p18 respecto a valores ideales empíricos	133
Tabla 4.10- Resumen de las estadísticas de Ramachandran para el <i>ensemble</i> de As-p18 determinadas por <i>PROCHECK-NMR</i>	133
Tabla 5.1- Asignación de resonancias amida de As-p18 de acuerdo al <i>Model Free</i> ...	147
Tabla 6.1- Residuos propuestos como responsables de la diferencia de volumen en las cavidades de L-FABP, A-FABP y As-p18.....	163
Tabla 6.2- Interacciones entre la molécula de oleato y residuos de As-p18, discriminado por secciones.....	168
Tabla 7.1- Ácidos grasos detectados como EMAGs provenientes de extractos de As-p18 y de lisado celular bacteriano	187
Tabla 7.2- Factores estructurales relacionados a la termodinámica de la unión a ácido oleico por As-p18	194
Tabla 7.3- Coeficientes de partición para derivados fluorescentes de ácidos grasos.....	204

Lista de Figuras

Figura 1.1- Distribución de las geohelminCIAS en el mundo.....	33
Figura 1.2- Ciclo de vida de áscaris.....	34
Figura 1.3- Huevo de áscaris.....	37
Figura 1.4- Proteínas mayoritarias presentes en el líquido perivitelino de huevos en estadio L3 de áscaris	38
Figura 1.5- Cambios en metabolitos durante el desarrollo de huevos de áscaris incubados a 30°C	40
Figura 1.6- Representación gráfica de iLBPs miembros de las cuatro subfamilias.....	44
Figura 1.7- Mecanismos de transferencia de ligandos a membranas de las iLBPs.....	45
Figura 1.8- Dendrograma a partir del alineamiento múltiple de iLBPs.....	47
Figura 1.9- Alineamiento de As-p18 con otras nemFABPs y A-FABP de ratón.....	48
Figura 2.1- Niveles de energía en presencia de un campo magnético externo, B_0	59
Figura 2.2- Etapas en el proceso de determinación estructural por RMN de una proteína.....	61
Figura 2.3- Contribuciones a la relajación de los núcleos debida a los movimientos aleatorios de la molécula e internos.....	66
Figura 2.4- Relación entre T_1 , T_2 , ^{15}N NOE y el tiempo de correlación en un campo de 14.1 Tesla	67
Figura 2.5- Modelos de difusión rotacional isotrópica de acuerdo al formalismo <i>Model Free</i>	69
Figura 3.1- Gel de agarosa con digestiones y <i>minipreps</i> de plásmido pQE-30.....	84
Figura 3.2- SDS-PAGE de <i>screening</i> de expresión, en células M15 (gel A) y BL21 (gel B).....	84
Figura 3.3- Representación del sistema de expresión: bacterias BL21 transformadas con los plásmidos pQE-30 y pREP4.....	85
Figura 3.4- Secuencia de la estrategia de purificación de As-p18.....	86
Figura 3.5- SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de afinidad y exclusión molecular.....	87
Figura 3.6- Perfil de elución de As-p18 a través de columna de exclusión molecular <i>Superdex 75 10/300 GL</i>	88
Figura 3.7- Cromatograma de As-p18 a través de columna RP-HPLC C_8	89

Figura 3.8- Análisis de SDS-PAGE de distintos métodos para recuperar ^{15}N ^{13}C As-p18 en muestras parcialmente degradadas.....	91
Figura 3.9- Cromatograma de As-p18 a través de columna de exclusión molecular acoplada a un detector de <i>light scattering</i>	92
Figura 3.10- Espectro 1D ^1H de As-p18.....	93
Figura 4.1- Comparación de espectros HNCO muestreados de forma convencional (violeta) o de manera no uniforme (azul).....	102
Figura 4.2- Espectro bidimensional ^1H - ^{15}N HSQC de As-p18 recombinante.....	104
Figura 4.3- Espectros HNCACB y CBCA(CO)NH empleados para la asignación secuencial.....	105
Figura 4.4- Espectro H(C)CH-TOCSY para la asignación de cadenas laterales	107
Figura 4.5- Ilustración de la asignación de cadenas laterales aromáticas en As-p18.....	108
Figura 4.6- Alineamiento de los valores consenso de <i>CSI</i> (barras) con la predicción de elementos estructura secundaria de As-p18.....	112
Figura 4.7- Esquemas de marcado isotópico para el complejo As-p18 - oleato.....	113
Figura 4.8- Espectros empleados para la asignación de la molécula de oleato y de los núcleos involucrados en la interacción proteína-ligando.....	114
Figura 4.9- Espectros de As-p18 durante el intercambio H/D.....	121
Figura 4.10- Gráfico de las 100 estructuras de As-p18 calculadas en la iteración 8 ordenadas en forma ascendente según la energía total.....	129
Figura 4.11- Visión estereoscópica de los 20 modelos superpuestos de As-p18.....	130
Figura 4.12- Relación entre restricciones de distancia NOE y RMSD en la estructura de As-p18.....	132
Figura 4.13- Representación de Ramachandran de la estructura de As-p18 (<i>ensemble</i> de 20 modelos).....	134
Figura 5.1- Valores de ^{15}N T_1 , T_2 y NOE heteronuclear para cada par N-H de la cadena principal de As-p18 a 60.8 MHz y 298 K.....	143
Figura 5.2- ^{15}N T_1 en función de T_2 para ^{13}C , ^{15}N As-p18 en su forma holo a 298K y 60.8MHz.....	145
Figura 5.3- Tiempos de Correlación Rotacional, τ_c estimados partir de R_1 y R_2	146
Figura 5.4- Distribución de modelos de movimientos internos a lo largo de la secuencia según el protocolo <i>Model Free</i>	148

Figura 5.5- Parámetros derivados del análisis <i>Model Free</i> graficados en función del número de residuo.....	149
Figura 5.6- Distribución de los hidrógenos de diferentes velocidades de intercambio a lo largo de la secuencia de As-p18.....	150
Figura 5.7- Ubicación de las señales amida ausentes y ensanchadas en apo As-p18, respecto de la forma holo.....	153
Figura 6.1- Modelo topológico de As-p18.....	160
Figura 6.2- A.- Diagrama de cintas de holo-As-p18. B.- Distribución de residuos dentro de la cavidad de As-p18.....	161
Figura 6.3- Representaciones de L-FABP, A-FABP y As-p18, indicando las cadenas laterales de los residuos enumerados en la Tabla 6.1.....	163
Figura 6.4- Ubicación de la molécula de oleato dentro de la cavidad de As-p18.....	165
Figura 6.5- Comparación de las posiciones que adoptan diversos ligandos dentro de la cavidad de distintas FABPs.....	166
Figura 6.6- Cadenas laterales expuestas en la superficie de As-p18.....	169
Figura 6.7- Potencial electrostático de superficie de holo-As-p18.....	170
Figura 6.8- <i>Loops</i> en As-p18 y AFABP.....	172
Figura 6.9- Alineamiento de secuencias de As-p18 y Bm-FAB-1.....	173
Figura 6.10- Representación de cintas de las estructuras de Bm-FAB-1 y As-p18.....	175
Figura 7.1- Placas de TLC de los extractos de As-p18 y del lisado celular bacteriano.....	185
Figura 7.2- Abundancia relativa de AGs extraídos de As-p18 y del lisado celular bacteriano.....	187
Figura 7.3- Espectros de emisión de fluorescencia modificados por la adición de ácido oleico.....	189
Figura 7.4- Preferencia de unión a AGs evaluada por desplazamiento de DAUDA.....	190
Figura 7.5- Calorimetría de Titulación Isotérmica de unión del ácido oleico a As-p18.....	192
Figura 7.6- Marca termodinámica en la interacción entre el ácido oleico y As-p18....	193
Figura 7.7- Regímenes de intercambio proteína ligando observados por RMN.....	195
Figura 7.8- Espectros ^{15}N -HSQC superpuestos de As-p18 con y sin ligando.....	196
Figura 7.9- Histograma de los CSP inducidos en las amidas peptídicas de	

As-p18 por la unión a oleato.....	197
Figura 7.10- Representación de cintas de As-p18 resaltando los residuos con CSP	
>1 σ_0 (naranja) ó >2 σ_0 (rojo) y aquellos visibles solo en la forma holo (verde).....	198
Figura 7.11- Titulación del ligando fluorescente 16AP con As-p18 seguida	
mediante espectroscopía de fluorescencia.....	201
Figura 7.12- Determinación de la constante de partición del 16AP entre la	
proteína As-p18 y las SUVs de EPC-NBD.....	203
Figura 7.13- Ensayo de transferencia de AOFA.....	206
Figura 7.14- Ensayo preliminar que muestra el efecto de la concentración de	
vesículas y fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia del 12AO.....	207
Figura G.1- Efecto de la inclusión de restricciones RDCs y de puente de hidrógeno	
en las etapas de refinamiento de la estructura de As-p18.....	255
Figura I.1- Espectro de CD (UV lejano) de Ov-FAB-1 luego del intento de	
renaturalización.....	258
Figura I.2- <i>Screening</i> de expresión Ov-FAB-1 con el sistema de chaperonas	
GroES- GroEL-tig.....	259
Figura J.1- SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de afinidad y exclusión	
molecular en la purificación de Bm-FAB-1.....	261
Figura J.2- Espectro bidimensional ^1H - ^{15}N HSQC de Bm-FAB-1 recombinante.....	262

Agradecimientos

Al CONICET, a la Wellcome Trust, y al Ministerio de Educación por la financiación y las becas otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Jurado, por el tiempo y la dedicación que implica la lectura y evaluación de una Tesis. Y de antemano, por los valiosos comentarios y aportes que puedan surgir.

A TODOS los que durante estos años integraron e integran el Lab 10, por hacer de este grupo de trabajo un súper-equipo que con solidaridad, mucho humor y dedicación emprende desafíos y supera dificultades.

A Betina, por la oportunidad de sumarme a su grupo, la confianza depositada para la realización de este proyecto y las posibilidades que esto me ha brindado en cuanto a mi crecimiento profesional y personal.

A Edu, Vale, Jor, Lu, Gise y Nati, por ser excelentes compañeros, por su amistad y por toda su ayuda y cariño en el día a día.

A Flor, mi hermana de tesis, con la que luchamos contra viento y marea (y lluvia de todo tipo, en tierras lejanas) para poder resolver las ansiadas estructuras! ☺. Por todo lo que compartimos en viajes, congresos, cursos y largas jornadas de trabajo, en donde no faltó oportunidad para atesorar memorables anécdotas.

A todo el personal del INIBIOLP, por su camaradería y a los que de una u otra manera contribuyeron a este trabajo de Tesis. Al grupo de Annie, en especial a Juan Pablo por su ayuda con el análisis de lípidos. A Marcos D. y Ana B. por la asistencia con el equipo de HPLC y al grupo de Patricia J., con el equipo de GC. A Mario por ayudarme diligentemente con muchas de las figuras aquí presentadas, complaciendo hasta el más mínimo detalle.

A Brian, por introducirme y guiarme en el mundo de la RMN, por todo lo que pude aprender de él. Por responder a una infinidad de mails e incluso leer la tesis...en castellano! A su amorosa familia: Ros, Seamus, Tara y el pequeño Sam por abrirme las puertas de su casa e integrarme como una más.

A Malcolm y Alan, por sus generosos aportes e ideas, por las reuniones musicales, por agasajarnos en las visitas a Glasgow. A Sharon y Margaret por su invaluable ayuda con las medidas de CD e ITC, respectivamente y por su simpatía.

A Kate y Steve, por estar siempre dispuestos a ayudar en lo que se necesitara y por los gratos momentos fuera del lab, por lo que también agradezco a Tere, Musadiq, Vibhuti y Matthias.

A todas las Cátedras que me han recibido durante estos años, por contribuir en mi formación. A Magui & cia en Biología. Al hermoso grupo de Química General / Introducción. A la Cátedra de Anatomía e Histología por el aguante y la estimulante vocación docente de sus integrantes, y especialmente a aquellos que se preocuparon por mí, ayudándome de muchas maneras.

A la gente de los institutos INIFTA, CIDCA y CINDEFI, que con su desinteresada colaboración no solamente me salvaron en más de una ocasión cuando algún equipo sufrió un desperfecto inesperado, además, porque sus gestos de pura solidaridad reconfortan y motivan la perseverancia.

Me siento privilegiada y muy agradecida con la educación pública que me ofreció los medios por los que pude acceder a mi formación y al mundo de las Ciencias. Agradezco profundamente a todos los educadores que me han acompañado y enriquecido en las distintas etapas del camino del aprendizaje. Docentes de todos los niveles, investigadores y mentores que tuve la suerte de conocer.

A mis amigas, Mary, Majo, Stelluchi, Marix, Pau, Vivi, Flor y Puli, por todos los momentos compartidos, por su amistad que me honra.

A mi familia toda por brindarme ese colchoncito de amor sobre el que siempre puedo repostar. Cada logro pequeño o grande se los debo a cada uno de Uds. por todo lo que me han dado y hecho por mí. Por recordarme las cosas importantes de la vida. A Susana por los momentos de reflexión.

A Santi, por ser mi complemento. Por su infinita paciencia, por cuidarme y contenerme. Por darme ánimos y siempre lograr arrancarme una sonrisa (o carcajada☺). Por bancarse la distancia, los horarios alocados, las idas al lab en los fines y por todos los rescates informáticos –que no fueron pocos–. Por acompañarme incondicionalmente en este proyecto y por tanto más..!

A todos aquellos que intervinieron para que hoy esté escribiendo estas palabras.

Abreviaturas/Acrónimos/Definiciones

16-AP Ácido 16-(9-anthroiloxi) palmítico

12-AO Ácido 12-(9-anthroiloxi) oleico

ACN Acetonitrilo

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNc Ácido desoxirribonucleico complementario

AG Ácido Graso

AOFA Antroiloxi-derivado de Ácido Graso

ARIA Ambiguous Restraints for Iterative Assignment

B₀ Campo Magnetico Externo

B_{ef} / B_{local} Campo Magnetico Efectivo

CCPNMR Collaborative Computing Project for NMR

CD Dicroísmo Circular

COL Colesterol

COLe Ésteres de Colesterol

CLP Cardiolipina

CMC Concentración Micelar Crítica

CNS Crystallography and NMR System

CPM Cuentas Por Minuto

CPMG Carr-Purcell-Meiboom-Gill

CSA (del inglés, Chemical Shift Anisotropy) Anisotropía de Desplazamiento Químico

Da Daltons

DAG Diacilglicéridos

DANGLE Dihedral Angles from Global Likelihood Estimates

DAUDA Ácido 11-((5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino) undecanoico

DPM Desintegraciones Por Minuto

EID Enfermedades Infecciosas Desatendidas

EMAGs Ésteres Metílicos de Ácidos Grasos

EPC Fosfatidilcolina de Huevo

FABP (del inglés, Fatty Acid Binding Protein) Proteína que Une Ácidos Grasos

A-FABP FABP de adipocito

B-FABP FABP de cerebro

E-FABP FABP de epidermis

I-FABP FABP de intestino

L-FABP FABP de hígado

M-FABP FABP de mielina

FMF Fast Model Free

FT Transformada de Fourier

Frecuencia de Larmor Frecuencia que describe el movimiento de precesión de un espín en presencia de un campo magnético externo. También se la llama frecuencia de resonancia y está asociada a la energía que lleva un fotón que provocaría la transición del espín entre los dos niveles de energía posibles.

FRET Transferencia de Energía de Resonancia de Förster

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HSQC (del inglés, Heteronuclear Single Quantum Coherence). Espectro base de los estudios de RMN multidimensional en proteínas. El ^{15}N -HSQC correlaciona el desplazamiento químico de un núcleo de ^1H con el correspondiente al núcleo de ^{15}N al que se encuentra enlazado. Se lo considera la “huella dactilar” de la proteína.

IPAP In-phase Anti-phase

IPTG Isopropil β -D-1-Tiogalactopiranosido

ITC Calorimetría de Titulación Isotérmica

MaxEnt Maximum Entropy

MCS Sitio de Clonación Múltiple

MW Peso Molecular (del inglés, Molecular Weight)

NBD-PC 1-oleoil-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil}-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

NOE Efecto Nuclear Overhauser

NUS Muestreo No Uniforme

OLA Oleato

PAGE Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

PBS Buffer Fosfato Salino

PC Fosfatidilcolina

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDB Protein Data Bank

PE Fosfatidiletanolamina

PI Fosfatidilinositol

PPM Partes Por Millón

PS Fosfatidilserina

RDC (del inglés, Residual Dipolar Coupling) Acoplamiento Dipolar Residual

RF Radiofrecuencia

RMN Resonancia Magnética Nuclear

RMSD (del inglés, Root Mean Squared Deviation) Desviación Media Estándar

SMILE (del inglés, Simplified Molecular Input Line Entry Specification). Es una especificación para describir sin ambigüedades la estructura de una molécula usando caracteres estándar.

SDS Dodecil Sulfato de Sodio

SUV (del inglés, Small Unilamellar Vesicles) Vesículas Unilamelares Pequeñas

τ_c Tiempo Correlación Rotacional

τ_m Tiempo Correlación Rotacional Molecular

τ_{mix} (del inglés, Mixing Time) Tiempo de Mezclado

TFA Ácido Trifluoroacético

TLC (del inglés, Thin Layer Chromatography) Cromatografía en Capa Fina

TOCSY Total Correlation Spectroscopy

TG Triglicéridos

rpHPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa

UV Ultravioleta

WT Wild-Type

Anglicismos

Docking: Acoplamiento molecular. Es un método en el campo del modelado molecular para predecir la conformación más probable de una molécula, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable.

Ensemble: Hace referencia a la familia de conformeros. Conjunto de estructuras que integra el resultado final de la resolución de un plegamiento mediante RMN.

FID: (del inglés, Free Induction Decay). Es la señal observable en RMN, generada por la precesión alrededor de un campo magnético debido al espín nuclear. Se obtiene mediante la aplicación de un pulso de radiofrecuencia en resonancia con la frecuencia de Larmor de los espines nucleares.

Lock: Señal para evitar la deriva y mantener constante el campo magnético de un espectrómetro durante la medida. Normalmente se utiliza la señal de deuterio con este fin.

Miniprep: Mini preparación de plásmidos.

Model Free: Modelo teórico ideado por Lipari y Szabo en 1982 por el que se asume cierta función de correlación para los núcleos de un sistema. A partir de este modelo se obtiene el parámetro de orden generalizado, S^2 y una constante de tiempo (τ) que describe la velocidad de movimientos internos. El término S^2 describe la amplitud de movimiento del vector internuclear (generalmente, NH), oscilando entre 0 y 1 para el desorden máximo y mínimo, respectivamente.

Overnight: Durante la noche. Se refiere al crecimiento de cultivos que se inoculan por la tarde y se dejan crecer durante toda la noche. El tiempo oscila entre 12 - 17 horas.

Photobleaching: Fotoblanqueo. Hace referencia a la destrucción fotoquímica de un fluoróforo.

Quencher: Hace referencia a una molécula que actúa como un extintor de la fluorescencia emitida por otra determinada sustancia.

Scan: Cada uno de los ciclos de pulsado completo más adquisición y posterior acumulación de datos de una secuencia de RMN.

Simulated Annealing: Proceso de cálculo mediante el cuál una secuencia de aminoácidos en estructura al azar y a muy alta temperatura, se pliega en sucesivos pasos hacia un mínimo local de energía cuando se disminuye la temperatura.

Tag: Etiqueta o marcador. Utilizado en este trabajo para referirse a la secuencia de polihistidinas a la cual se fusiona una proteína a purificarse por afinidad por níquel (His-tag).

Tumbling: Hace referencia al movimiento aleatorio, o movimiento browniano de las moléculas en solución.

Publicaciones

Los resultados presentados en esta Tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Resonance assignment of As-p18, a fatty acid binding protein secreted by developing larvae of the parasitic nematode *Ascaris suum*. (2012) Ibáñez Shimabukuro M, Rey-Burusco MF, Cooper A, Kennedy MW, Córscico B, Smith BO. *Biomol NMR Assign* 2014 Apr;8(1):33-6. Epub 2012 Dec 6.

Useable diffraction data from a multiple microdomain-containing crystal of *Ascaris suum* As-p18 fatty-acid-binding protein using a microfocus beamline. (2012) Gabrielsen M, Riboldi-Tunncliffe A, Ibáñez-Shimabukuro M, Griffiths K, Roe AJ, Cooper A, Smith BO, Córscico B, Kennedy MW. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012 Aug 1;68(Pt 8):939-41. Epub 2012 Jul 31.

Análisis estructural y funcional de proteínas solubles que unen lípidos de parásitos helmintos. (2013) Franchini GR, Córscico B, Pórfido JL, Silva V, Ibáñez Shimabukuro M, Rey Burusco MF. *Acta bioquím clín latinoam* 47(2):377-384.

The unusual lipid binding proteins of parasitic helminths and their potential roles in parasitism and as therapeutic targets. (2014) Franchini GR, Pórfido JL, Ibáñez Shimabukuro M, Rey Burusco MF, Bélgamo JA, Smith BO, Kennedy MW, Córscico B. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Submitted.

Resumen

As-p18 es una de las proteínas más abundantes del fluido que baña a la larva infectiva, L3, dentro de los huevos, particularmente resistentes, del parásito *Ascaris suum*. Es una proteína que une lípidos, perteneciente al grupo de las FABPs, aunque por presentar características únicas, exclusivas para nematodos, se las asocia a un nuevo *subcluster*, las nemFABPs. Dentro de las peculiaridades de las nemFABPs se destacan: poseer señal de secreción, estar bajo una estricta regulación de síntesis y poseer una estructura con ciertas características no presentes en otros miembros de la superfamilia. Tomando como base estas diferencias, se ha propuesto que las nemFABPs presentarían funciones específicas, de relevancia en la supervivencia de estos organismos, tal vez involucrando la captación, la distribución y/o el almacenamiento de lípidos.

Con la finalidad de contribuir al entendimiento de la estructura y función de este singular grupo de proteínas, se abordaron estudios estructurales y de dinámica, empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Por otra parte, se determinaron las propiedades de unión a lípidos, haciendo uso de variadas técnicas biofísicas y bioquímicas. Por último se analizó la capacidad de As-p18 para transferir ácidos grasos a membranas modelo y se realizaron ensayos preliminares para caracterizar la interacción con las mismas.

El plegamiento tridimensional determinado en solución, mostró que As-p18 presenta componentes estructurales que caracterizan a la familia de FABPs. Dentro de los mismos se encuentran: el barril β , formado por 10 hebras β antiparalelas cubierto por el motivo hélice-vuelta-hélice; la hendidura o *gap* entre las hebras β D y β E; una cavidad interna que incluye al sitio de unión al ligando y que involucra residuos de aminoácidos polares e hidrofóbicos; y una región portal postulada como lugar de entrada del ligando, delimitada por los *loops* entre β C- β D y β E- β F, y la α -hélice II. Sin embargo, a pesar de presentar un plegamiento FABP canónico, As-p18 mostró características que la diferencian de cualquier estructura de FABP descrita hasta el presente. Los *loops* entre las hebras β B y β C, y β G y β H, son notablemente más largos que los presentes en cualquier otra FABP, llegando al doble de longitud para el primer caso. En cuanto a los residuos que estabilizan la unión del ligando, se comprobó la participación de la Arginina 43, que dada su ubicación relativa en la proteína, representa un elemento atípico respecto a lo observado para otras FABPs. Aminoácidos hidrofóbicos

protruyentes, que flanquean la región portal, estarían potencialmente involucrados en interacciones proteína-proteína o proteína-membrana.

Los estudios de unión a lípidos mediante TLC y cromatografía gaseosa mostraron que la proteína recombinante une de manera exclusiva ácidos grasos (AGs) dentro de un entorno lipídico celular como el provisto por *E. coli*. Entre los AGs seleccionados del medio por la proteína, se comprobó un enriquecimiento relativo de ácido oleico (18:1). La particular afinidad por este lípido se corroboró mediante experimentos de fluorescencia involucrando el desplazamiento competitivo de una sonda fluorescente. Asimismo, estudios por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y RMN, permitieron establecer un único sitio de unión, de alta afinidad, donde la contribución entálpica fue preponderante. En cuanto a la habilidad de As-p18 para ceder AGs a vesículas o membranas modelo, se ha propuesto que la transferencia de ligandos ocurre mediante interacciones proteína-membrana. En este sentido, se analizaron de forma preliminar qué factores modulan dicha interacción.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis contribuirían a la comprensión del rol de As-p18 en los huevos infectivos de *A. suum*. De manera más general, constituyen el paso inicial para el mejor entendimiento del nuevo *subcluster*, nemFABP, dentro de la familia de las FABPs.

1. Introducción

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

1. Introducción

El objeto de estudio de esta Tesis lo constituye la proteína que une lípidos (LBP), As-p18, perteneciente a un nematodo del género *Ascaris*. A nivel morfológico y bioquímico la especie de *Ascaris* que afecta a humanos, –var. *lumbricoides*– es indistinguible de la que afecta a cerdos, –var. *suum*–. Puesto que ambas especies, no sólo son morfológica y antigénicamente idénticas, sino que también comparten un ciclo de vida similar y constituyen relaciones huésped-parásito naturales comparables (Murrel et al., 1997), numerosos trabajos emplean esta última especie como modelo de la primera, en función de la mayor facilidad para obtener muestras biológicas (Kim et al., 2012; Cruz et al., 2012). Incluso si se trata de la misma especie es motivo de debate actual (Peng et al., 2012; Leles et al., 2012; Dutto & Petrosillo, 2013).

Dada la relevancia de las infecciones ocasionadas por este parásito, se incluyen en este capítulo de introducción, un resumen de los aspectos epidemiológicos y del ciclo de vida de *Ascaris* spp.

Por otro lado, resulta interesante destacar que áscaris junto con otros nematodos, poseen características únicas no presentes en otros animales multicelulares. Algunas de las más notables son la capacidad de generar glucógeno a partir de triglicéridos por medio del ciclo del glioxilato (Barret et al., 1970), producir quitinasas típicas de plantas (Geng et al., 2002) y contener genes de hemoglobina de estructura similar a los que presentan las plantas (Sherman et al., 1992). Teniendo en cuenta la capacidad de unir ligandos hidrofóbicos por parte de la proteína de estudio, se introducirán algunos conceptos vinculados a peculiaridades del metabolismo lipídico del parásito.

Considerando la localización de As-p18, también se mencionan las características del entorno y las estructuras que la circundan.

Puesto que As-p18 pertenece a la familia de las LBPs, se presenta en este capítulo una breve descripción de los aspectos más sobresalientes de este grupo de proteínas.

Por último, se sintetiza el estado del conocimiento en lo que concierne específicamente a la proteína de estudio, para concluir con los objetivos y organización de la presente Tesis.

1.1 Áscaris y Geohelmintiasis

Los geohelminthos son parásitos intestinales que presentan como parte de sus ciclos de vida un pasaje por la tierra. Entre ellos se destacan: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y las uncinarias, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*. Las infecciones¹ que ocasionan son consideradas globalmente como un problema de salud pública, siendo importantes causas de morbilidad y mortalidad (Dold & Holland, 2011). A pesar de su importancia a nivel educativo, económico y de salud pública, estas parasitosis son ampliamente ignoradas, incluidas dentro del grupo de las EID, Enfermedades Infecciosas Desatendidas (PAHO, 2009). Como se aprecia en la Figura 1.1, la distribución y prevalencia de las geohelmintiasis se intensifica en las zonas tropicales y subtropicales, en estrecha relación con condiciones sanitarias deficientes y determinantes socio-demográficos característicos de países en vías de desarrollo.

En América Latina se estima que entre 10 y 20% de la población está infectada con algún un tipo de geohelminto, y un estudio reciente indica que casi 50 millones de niños en edad escolar y preescolar se hayan en riesgo de infección (Saboyá et al., 2013). En Argentina –país endémico–, la frecuencia de geohelmintiasis es muy variable (0.6 – 75%), distribuyéndose de manera heterogénea a lo largo del país (Gamboa et al., 2009). En particular para la parasitosis causada por áscaris, los estudios epidemiológicos son igualmente impactantes, revelándolo como el agente infeccioso con mayor prevalencia a nivel mundial, con un cuarto de la población del planeta afectada. (Bethony et al., 2006; Schüle et al., 2014). En nuestro país, una revisión sistemática reciente (Socías et al. 2014) reporta un rango de prevalencia de infección por *A. lumbricoides* entre 0 y 67%, si bien se advierte que la escasez de datos y la existencia de grandes segmentos territoriales y poblacionales sin estudios de prevalencia podrían asociarse a una subestimación de los casos de parasitismo. Aunque las geohelmintiasis se dan en personas de todas las edades, afectan principalmente a niños en edad pre-escolar y escolar convirtiéndose en una de las causas más importantes de retraso en el desarrollo físico e intelectual a nivel mundial. Varios estudios han señalado el profundo impacto

¹ Si bien el término *infección* suele reservarse para la invasión por microorganismos, empleándose el término *infestación* para la invasión del organismo por macroparásitos, los significados y traducciones del inglés no son completamente coincidentes (Navarro, 2011). En tanto que la mayoría de las publicaciones especializadas en idioma castellano acuñan para *infección* la acepción inglesa del vocablo *infection* (que incluye a varios nematodos dentro de los agentes infecciosos, por ser parásitos internos), se toma ese sentido a lo largo de este trabajo de Tesis.

que tienen estas infecciones sobre el desempeño escolar y la productividad económica futura (Guyatt, 2000; Miguel & Kremer, 2003; Baird et al., 2011).

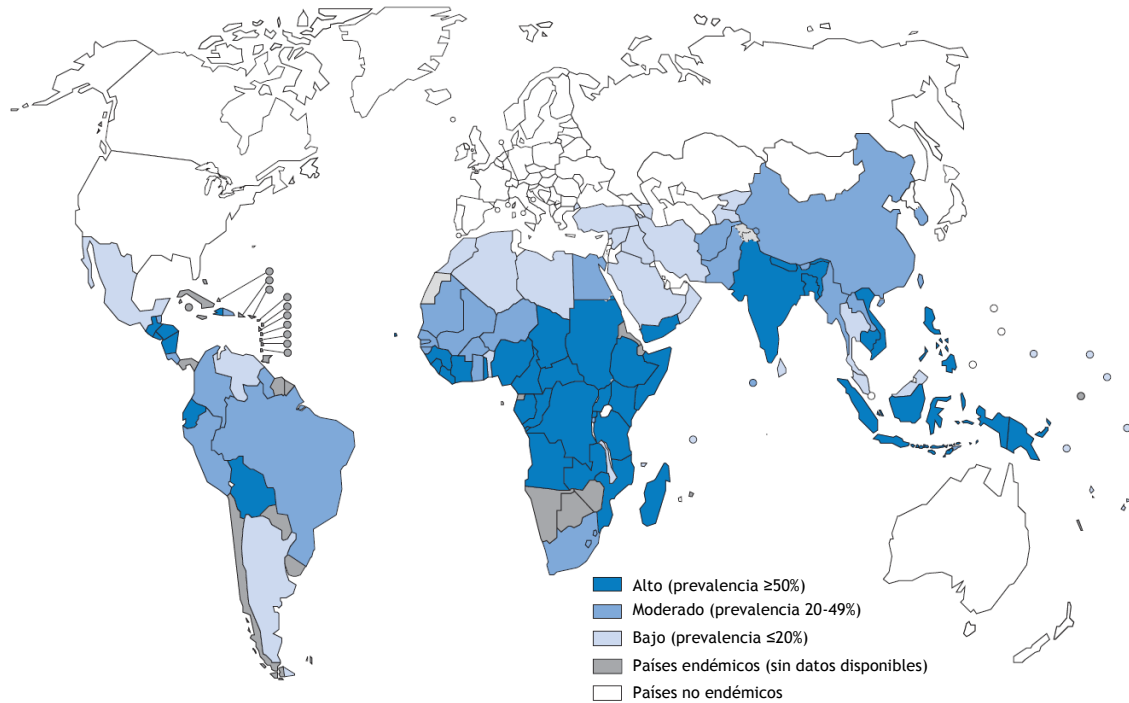


Figura 1.1. Distribución de las geohelmintiasis en el mundo. Se indican en el código de colores los rangos de índice de prevalencia. Adaptado del Reporte de la Organización Mundial de la Salud sobre enfermedades desatendidas (World Health Organization, 2010).

Clínicamente las geohelmintiasis se caracterizan por la inflamación crónica y una serie de síndromes asociados, mediados por la anemia y la desnutrición (Crompton & Nesheim, 2002). Generalmente, los efectos sobre la salud quedan enmascarados y hasta incluso son subestimados por ser, en su mayoría, de instalación lenta y de difícil diagnóstico dada la inespecificidad de sus síntomas. Particularmente, en el caso de infecciones severas por áscaris se presentan patologías de mayor gravedad asociadas a las migraciones de las larvas en distintos sitios del organismos y a fenómenos obstructivos en el intestino (Botero & Restrepo, 2003).

Además de los factores socioeconómicos, existen otros determinantes que facilitan el establecimiento y propagación de la ascariasis, relacionados a la biología del parásito y las características medioambientales (WHO, 1987). Estos últimos factores pueden comprenderse teniendo en cuenta el ciclo biológico que presenta este parásito.

Ciclo Biológico

Los parásitos del grupo de los geohelminintos tienen un ciclo biológico que se cumple entre un huésped y el suelo (Altcheh et al., 2007). Los estadios de tierra constituyen el ciclo extrínseco y los estadios del cuerpo humano forman el ciclo intrínseco de los geohelminintos, señalados con flechas rojas y azules, respectivamente en la Figura 1.2.

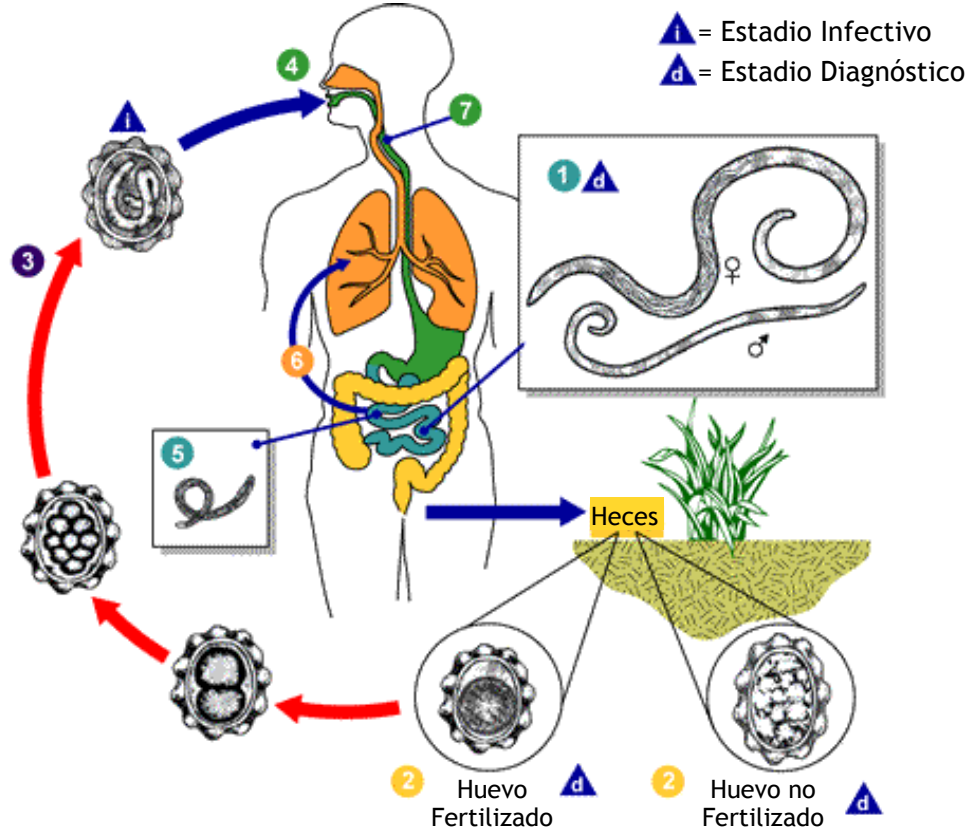


Figura 1.2. Ciclo de vida de áscaris. Los parásitos adultos ① viven en el lumen del intestino delgado. Una hembra puede producir ~200000 huevos por día que son eliminados con las heces ②. Los huevos no fertilizados no experimentarán desarrollo biológico. Los huevos fértiles embrionados se vuelven infectivos entre la 2da y 8va semana ③, dependiendo de las condiciones ambientales. Una vez que son ingeridos ④, la larva eclosiona ⑤, invade la mucosa intestinal y alcanza los pulmones vía circulación sistémica ⑥. Luego de madurar en los pulmones, la larva atraviesa la pared alveolar, asciende a través del árbol bronquial hacia la garganta para ser deglutida ⑦. Tras alcanzar el intestino delgado, se desarrolla a la forma adulta ①. 2 a 3 meses luego de la infección la hembra comienza la oviposición de huevos fertilizados y no fertilizados. Los adultos viven entre 1 y 2 años. Imagen adaptada del sitio web del CDC de Estados Unidos (<http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>). Texto enriquecido según Botero & Restrepo (2003).

Las formas adultas de *áscaris* se alojan en la extensión del intestino delgado y presentan dimorfismo sexual. Las hembras miden entre 20-30 cm, y se diferencian de los machos

más pequeños (15-20 cm), no sólo por el tamaño sino también por la forma del extremo posterior, que en los ejemplares hembra termina en forma recta, mientras que en los machos presenta una curva con 2 espículas retráctiles para la copulación. La gran capacidad reproductiva de las hembras constituye un factor importante que favorece la diseminación de la ascariasis. En su estadio adulto, las hembras llegan a liberar más de 200000 huevos por día. Así, una cantidad enorme de huevos fertilizados se eliminan al exterior con las heces y su destino dependerá del lugar donde se hayan depositado. Si los huevos fertilizados contenidos en la materia fecal alcanzan la tierra en condiciones de humedad y sombra con temperaturas cálidas a templadas, en el transcurso de 2 a 8 semanas sucede la formación y muda de las larvas desde el estadio L1 hasta el estadio L3, convirtiéndose en huevos infectantes (Geenen et al., 1999; Fagerholm et al., 2000). La supervivencia de los huevos, una vez infectivos es extremadamente larga, pudiendo llegar a los 15 años (O'Lorcain & Holland, 2000). La gran resistencia de la forma infectiva al paso del tiempo y a diversos agentes del ambiente es otro de los factores que incrementan las posibilidades de que la infección se perpetúe en las zonas endémicas.

Los humanos contraen la ascariasis por ingestión de los huevos infectivos a través de la contaminación fecal de alimentos y utensilios, geofagia y/o hábitos no higiénicos. Una vez en el organismo comienza el ciclo intrínseco del parásito. Los huevos progresan por la vía digestiva y a la altura del duodeno eclosionan para permitir la salida de la larva L3. Una vez liberada, atraviesa la mucosa de la pared duodeno-yeyunal. En la cavidad abdominal ingresa en los vasos linfáticos mesentéricos o en las vénulas mesentéricas portohepáticas por donde alcanzan las cavidades derechas del corazón y los pulmones. Después de permanecer varios días en los capilares se abren paso hacia los alvéolos pulmonares de manera traumática, dado que en este pasaje producen la rotura de vasos y tejidos para alcanzar el interior de la vía respiratoria. Penetran por los alvéolos, ascienden por los bronquiolos, bronquios, tráquea y epiglotis, desde donde son deglutidas para pasar por el esófago y el estómago hasta el intestino delgado, donde maduran hasta la forma adulta macho, o hembra. El ciclo intrínseco de *A. lumbricoides* dura entre 60 y 90 días, y una vez alcanzado los estadios adultos, viven entre uno y dos años.

Fisiología de Áscaris

Áscaris pertenece al Phylum Nematoda, el cual representa uno de los grupos de invertebrados más numeroso, tanto en especies como en números de individuos.

Comprendiendo especies de vida libre y parasitas de plantas, animales y del hombre, los nematodos presentan una anatomía constante. Típicamente las formas adultas se presentan como gusanos cilíndricos, de simetría bilateral, con extremos aguzados, no segmentados, provistos de una cavidad pseudocelómica (Bird & Bird, 1991). Exteriormente, su cuerpo se halla revestido por una cutícula segregada por la capa hipodérmica subyacente y que forma la pared corporal junto con otra capa más interna de tejido muscular. La cavidad pseudocelómica, limitada entre la pared corporal y la del intestino, se encuentra llena de líquido o hemolinfa, y allí están contenidos los sistemas digestivo completo, nervioso constituido por troncos, excretor, y el sistema reproductor que es el más desarrollado y con dimorfismo sexual. No presentan sistema respiratorio, locomotor, ni circulatorio. Sin embargo, por medio del pseudoceloma es posible el transporte de los metabolitos y conjuntamente con la musculatura y la cutícula funcionan como un esqueleto hidrostático que permite los movimientos del esófago y ondulatorios del parásito (Gállego Berenguer, 2007). En el caso de áscaris, al no poseer órganos de fijación, estos movimientos activos y constantes son los que le permiten a la forma adulta mantenerse en el lumen del intestino del huésped, evitando ser arrastrados por los movimientos peristálticos.

Huevo de Áscaris

En cuanto a las características generales de los huevos de áscaris, cuando son puestos fertilizados, tienen una forma ligeramente oval o subesférica ($45-70 \times 40-50 \mu\text{M}$), cubierta externa de grosor bastante uniforme, claramente mamelonada. En su interior encierran una célula cigoto, esférica, que no llena por entero su cavidad. Cuando son puestos sin fertilizar (lo que ocurre cuando se trata de hembras jóvenes o en ausencia de machos) los huevos estériles se distinguen de los anteriores por su mayor longitud ($85-95 \times 45 \mu\text{M}$), el aspecto muy irregularmente mamelonado de su cubierta, y por tener su cavidad totalmente obliterada por una masa amorfa y granulosa (Cruz-Reyes & Camargo-Camargo, 2001).

Los huevos se hallan protegidos por una cáscara de un espesor de aproximadamente $4.5 \mu\text{m}$, compuesta por cuatro capas. Desde el interior al exterior se encuentra: (i) una capa lipóide resistente a la desecación y a la penetración de las sustancias polares; (ii) una capa quitinosa, mecánicamente rígida; (iii) una membrana vitelina delgada, derivada de la membrana vitelina del ovocito; y (iv) una capa uterina externa casi impermeable (excepto para gases y disolventes orgánicos). La capa interna lipóide se compone de un

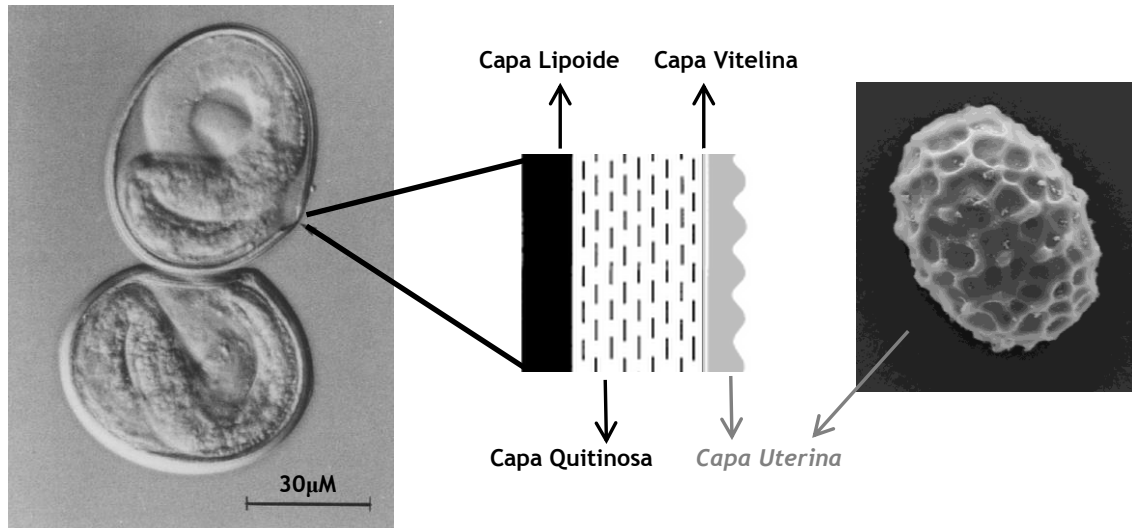


Figura 1.3. Huevo de áscaris. A la izquierda se muestra una imagen por microscopía de contraste de fases de huevos de *A. suum* decorticados (capa uterina mamelonada, removida) con las larvas L3 en su interior (adaptado de Geenán et al. 1999). En el centro, esquema de la composición de la cáscara del huevo según Wharton (1980). A la derecha, microscopía electrónica de barrido de un huevo de *A. suum* donde se aprecia la capa uterina (Sengupta, 2012).

25 % de proteínas y un 75 % ascarósidos (3,6-dideoxi-L-arabinohexosa unido a un alcohol de cadena larga por un enlace glucosídico) y es esta capa a la que se le adjudican las propiedades responsables de la extremada resistencia de los huevos (Wharton, 1980; Quilès et al., 2006). Así, la impermeabilidad de la membrana interna de ascarósidos protege a los huevos de una variedad de ácidos y bases fuertes, agentes oxidantes, reductores, proteolíticos y tensioactivos (Barrett, 1976). La capa de quitina se compone de microfibrillas de quitina (un homopolímero de N-acetil-D-glucosamina unida por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$), dentro de una matriz de proteínas. El recubrimiento más externo consiste en proteínas y mucopolisacáridos depositados cuando el huevo pasa a través del oviducto y del útero después de la fertilización. Imágenes por microscopía electrónica de barrido han revelado que la superficie de los huevos de áscaris se divide en depresiones y crestas (Figura 1.3). Esta capa mamelonada se tiñe con la bilis del entorno para tomar un color marrón dorado, protegiéndolo del efecto nocivo de las radiaciones UV y convirtiéndolo, por ejemplo, en el patógeno transmisible por el agua más resistente a la radiación UV identificado hasta el presente (Brownell & Nelson, 2006).

Entre el citoplasma y la capa lipoide de los huevos fertilizados hay una cavidad llena de fluido que corresponde al espacio perivitelino (Rogers, 1956). El fluido perivitelino

baña a la larva en desarrollo, y en el estadio infectivo comprende el 25% del volumen total del huevo (Fairbairn, 1957). En cuanto a su composición, se destaca la trehalosa en una concentración que oscila entre 0.1 – 0.2 M. La alta concentración de trehalosa en el líquido perivitelino contribuye a la protección de las membranas, tanto de la cáscara del huevo como de la larva en desarrollo, bajo condiciones ambientales adversas, tales como la desecación y la congelación. Además se ha establecido que funciona como fuente de energía y participa en el proceso de eclosión (Behm, 1997). En conjunto, las capas del huevo con el líquido perivitelino protegen al estadio infectivo de la pérdida de agua y mantiene a la larva en un estado quiescente (Perry & Moens, 2011).

El análisis por electroforesis en dos dimensiones del líquido perivitelino de huevos infectivos en estadio L3, reveló la presencia de siete proteínas mayoritarias (Figura 1.4) (Mei et al., 1997). El análisis de secuencia de NH₂ terminal permitió identificar a las proteínas de 50 y 43 kDa como quitinasas. La proteína de 16 kDa pareció ser un homólogo de transtirretina y la de 12.5 kDa, el alérgeno ABA-1 (Geng et al., 2002). La proteína con un peso aparente de 18 kDa, As-p18, se identificó como un miembro de una clase única de proteínas que unen ácido grasos (FABP) de nematodos, con la característica inédita de ser secretada por las células que la sintetizan (Mei et al., 1997).

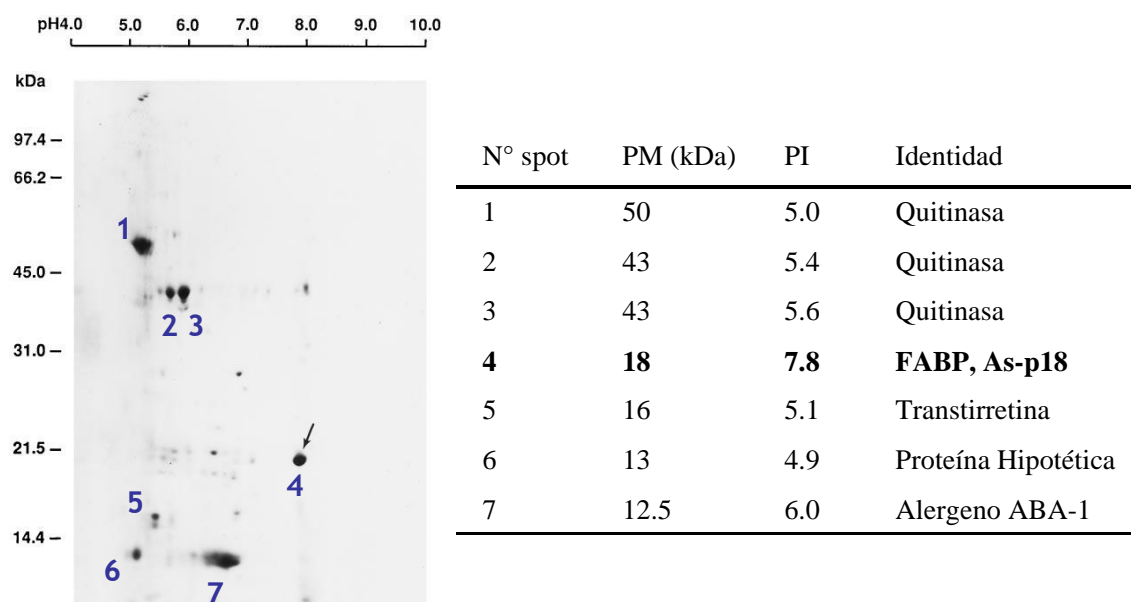


Figura 1.4. Proteínas mayoritarias presentes en el líquido perivitelino de huevos en estadio L3 de áscaris. A la izquierda se muestra la electroforesis en gel bidimensional del fluido perivitelino, indicando con una flecha a la mancha correspondiente a As-p18 (Mei et al., 1997). A la derecha, la lista de las siete proteínas más abundantes identificadas subsecuentemente por el grupo de Komuniecki (Geng et al., 2002).

Los huevos amniotas (o cleidoicos) como los de áscaris, se caracterizan por poseer una amplia reserva de lípidos y la utilización de los mismos en una determinada etapa de su desarrollo (Fairbairn, 1957). Se especula que el metabolismo lipídico en los nematodos adultos es principalmente anabólico, con un depósito masivo de los lípidos sintetizados en los ovocitos. Por su parte, el catabolismo de estos compuestos se produce de manera conspicua en los huevos, que experimentan una supervivencia prolongada luego de la embrionación (Khanna & Yadav, 2004). Respecto a la capacidad de síntesis lipídica *de novo*, estudios mediante la incorporación ^{14}C -acetato demostraron la capacidad de los tejidos intactos muscular y reproductivo en las formas adultas del parásito, de incorporar ^{14}C -acetato a lípidos celulares (ésteres de ascarósidos, ácidos grasos saturados e insaturados). Más allá de esta capacidad, puesto que áscaris asimila grandes cantidades de lípidos en el proceso de producción de huevos, debe depender en gran medida de la dieta del huésped para proporcionar las concentraciones necesarias de ácidos grasos (AGs) (Beames et al., 1967). En los huevos, por su parte, si bien predomina el catabolismo lipídico, también se ha demostrado la capacidad de sintetizar AGs *de novo* (Furukawa et al., 1985). No se encuentra en la literatura reportes detallados sobre la composición lipídica de las reservas en el huevo de áscaris. Se ha reportado que la fracción lipídica comprende mayormente triglicéridos y ascarósidos (Fairbairn, 1957). También se encuentra documentada la presencia de cantidades menores de mono y di-glicéridos, AGs libres, colesterol libre y esterificado, y los fosfolípidos: lisofosfatidilcolina, fosfatidilinositol, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, y un fosfolípido no identificado (Lee et al., 1977). Respecto a la localización de los distintos lípidos, Fairbairn aclara en otro estudio (Fairbairn, 1955), que no se puede asegurar si las reservas lipídicas – innegablemente abundantes– están localizadas exclusivamente en el protoplasma dado que la metodología para separarlo de la cáscara no puede aplicarse a huevos embrionados. Por otro lado, sí se encuentra cierta información sobre los cambios notables que se producen en los lípidos y en otros metabolitos durante la maduración del huevo. Así, se reporta una disminución en el total de la fracción lipídica (17%) durante el desarrollo del embrión vermiforme en los huevos incubados a 30°C, disminución que se encuentra confinada a los triglicéridos; sin registrarse cambios en las fracciones de los ascarósidos y de los fosfolípidos. En la fracción de triglicéridos, los AGs volátiles y no volátiles desaparecen en una proporción semejante. Los resultados de un análisis más extenso se representan en la Figura 1.5. De acuerdo a los

experimentos conducidos por Passey y Fairbairn (1957), los lípidos totales se reducen de 36% a 32.5% durante los primeros 10 días de embrionación, y del 32.5% al 21.5% durante los siguientes 10 días, durante los cuales el embrión vermiforme madura y muda al estadio infeccioso L3. Sólo una parte de los lípidos que desaparece es completamente oxidada; el resto, donde se incluyen los ácidos grasos de cadena larga (AGCL), se oxida parcialmente y luego se utiliza para la síntesis de carbohidratos, mediante el ciclo del glioxilato (Komuniecki & Tielens, 2003). De esta manera, al día 25 se restauran los niveles de trehalosa y glucógeno consumidos en forma limitada durante los primeros 10 días. En un estudio posterior al de Passey y Fairbairn, (Jezyk & Fairbairn, 1969), se revelan de manera discriminada los cambios en la composición de los triglicéridos considerando los AGs más abundantes; y se determina que los más utilizados en base al número de átomos de carbono con que contribuyen son los AGs 16:0, el 18:1 y el 18:2.

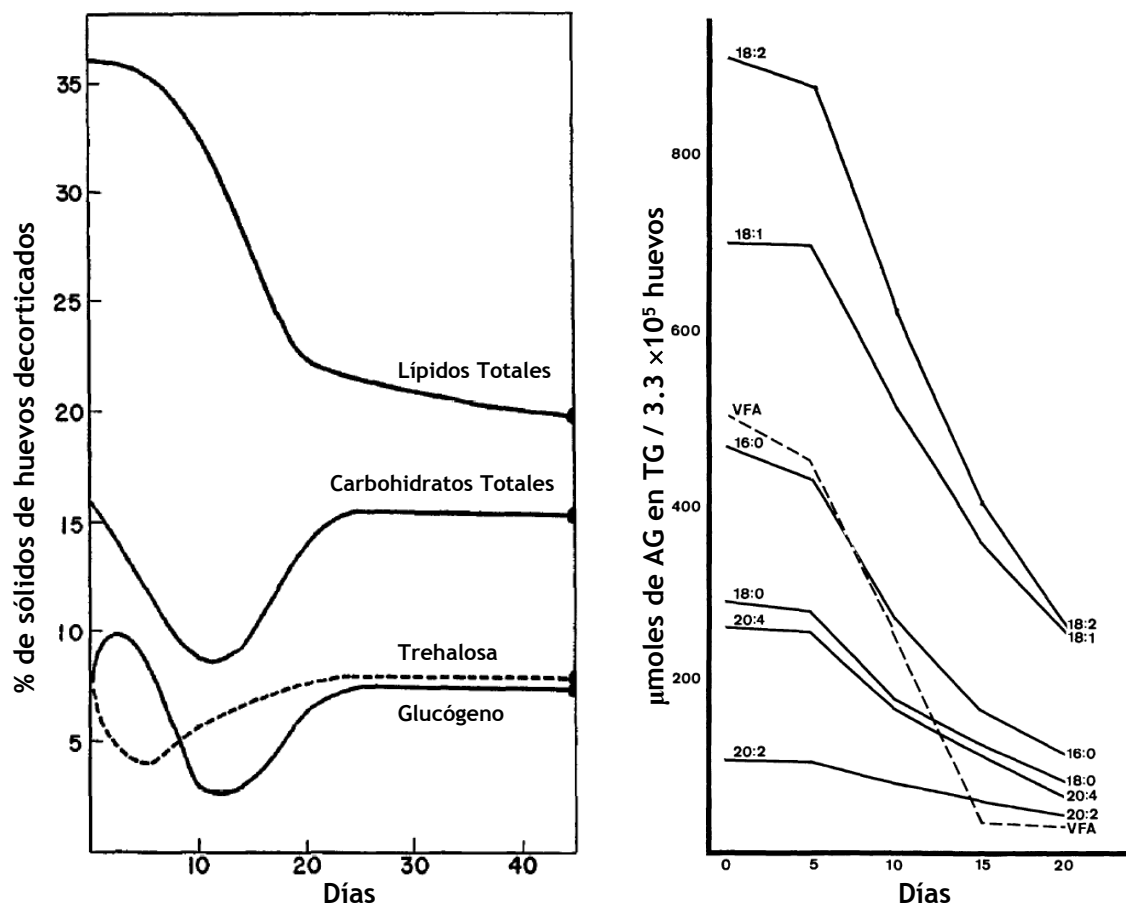


Figura 1.5. Cambios en metabolitos durante el desarrollo de huevos de áscaris incubados a 30°C. A la izquierda se muestra la variación de los lípidos y carbohidratos totales, glucógeno y trehalosa (Passey & Fairbairn, 1957). A la derecha, los cambios en la composición de los TG en función de los días de incubación (Jezyk & Fairbairn, 1969) (VFA=ácidos grasos volátiles).

1.2 Proteínas que Unen Lípidos (LBPs)

Las denominadas proteínas intracelulares que unen lípidos (iLBPs) son proteínas altamente conservadas que unen en forma no covalente AGCL y otros ligandos hidrofóbicos. Pertenecen a una familia multigénica de proteínas de bajo peso molecular (~14 kDa), con una distribución filogenética muy amplia (Ockner et al., 1972; Esteves & Ehrlich, 2006). Esta familia incluye a las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs), la proteína ileal de unión a lípidos y las proteínas que unen retinoides. La Tabla 1 proporciona una lista con la nomenclatura de las iLBPs identificadas en mamíferos y los principales sitios de localización. La denominación original que se ha otorgado a las FABPs está relacionada con el tejido u órgano en el que originalmente fueron encontradas, si bien esto no necesariamente implica la exclusividad de expresión en dicha localización.

Se ha establecido que las iLBP evolucionaron a partir de un gen ancestral común, coincidiendo con la aparición de la oxidación mitocondrial (Lücke et al., 2006). Estas proteínas, notablemente conservadas en todo el reino animal, si bien fueron reportadas inicialmente en tejidos de mamíferos, paulatinamente fueron sumándose caracterizaciones en aves, peces, anfibios, insectos y helmintos (Santomé et al., 1998). La expresión de estas proteínas guarda relación con la capacidad del tejido de origen para metabolizar lípidos. De esta manera, las iLBPs alcanzan las concentraciones más elevadas en aquellos tejidos que poseen una gran capacidad oxidativa y/o de almacenamiento de lípidos (Londrville, 1996).

La identidad de secuencia en esta familia, oscila entre el 25% para algunos miembros parálogos y más del 90% para algunos ortólogos. Sin embargo, todas las proteínas comparten una estructura terciaria altamente conservada que resulta prácticamente superponible (Haunerland & Spener, 2004). El plegamiento característico comprende un barril- β formado por dos hojas de disposición ortogonal, cada una de ellas conteniendo cinco hebras- β antiparalelas. Las hebras (nombradas desde βA hasta βJ , comenzado por el extremo N-terminal) están conectadas por *loops* a excepción de las dos primeras que se encuentran separadas por un motivo hélice-vuelta-hélice que actuaría a modo de tapa del barril. De esta manera, queda determinada una cavidad central, en el interior del barril- β , la cual está destinada a albergar a los ligandos hidrofóbicos y que presenta la singularidad de contener un gran número de residuos hidrofílicos involucrados en redes de puentes salinos y puentes de hidrógeno. Dado que la cavidad no es directamente

	Nombre	Gen	Identificada en:	Expresión	Ligandos naturales
I	CRBP I			Hígado, riñón, testículo, pulmón	Retinol, ác. retinoico
	CRBP II			Intestino delgado	Retinol, ác. retinoico
	CRBP III			Corazón, músculo, tejido adiposo	Retinol, ác. retinoico
	CRABP I			Cerebro, piel, testículo	Ác. retinoico
	CRABP II			Epidermis, glándula adrenal	Ác. retinoico
II	L-FABP	<i>FABP-1</i>	Hígado	Hígado, intestino delgado	AGCL, acil-CoA, MG, sales biliares, grupo hemo, lisoPL
	I-BABP	<i>FABP-6</i>	Intestino delgado (distal)	Intestino delgado (distal), ovario, glándula adrenal, estómago	Sales biliares
III	I-FABP	<i>FABP-2</i>	Intestino delgado (proximal)	Intestino delgado (proximal), hígado	AGCL
IV	A-FABP	<i>FABP-4</i>	Tejido adiposo	Adipocitos, macrófagos, células dendríticas	AGCL
	B-FABP	<i>FABP-7</i>	Cerebro	Cerebro, SNC	AGCL
	E-FABP	<i>FABP-5</i>	Piel	Epidermis, lengua, testículo, glándula mamaria	AGCL
	H-FABP	<i>FABP-3</i>	Corazón	Músculo esquelético y cardíaco, cerebro, riñón, ovario, testículo, glándula adrenal, estómago, pulmón	AGCL
	M-FABP	<i>FABP-8</i>	Células de la vaina de mielina	SNP, células de Schwann	AGCL
	T-FABP	<i>FABP-9</i>	Testículo	Testículo, glándula mamaria, glándula salival	AGCL
	—	<i>FABP-12</i>	Retina	Retina, testículo, corteza cerebral	?

Tabla 1.1. iLBPs de mamíferos. AGCL= Ác. grasos de cadena larga; MG=monoglicéridos; lisoPL=lisofosfolípidos. (Tabla editada según Storch & Thumser, 2010 y Smathers & Petersen, 2011).

accesible al solvente, se propone que para que el ligando pueda unirse, suceden pequeños cambios conformacionales en una zona de la proteína denominada “región portal” (Banasak et al., 1994). Esta región involucra a la porción C-terminal de la hélice II, el segmento que une α -II con la hebra β B y los loops entre las hebras β C- β D y β E- β F.

De acuerdo a la homología de secuencia y las propiedades de unión a ligandos, las iLBPs se dividen en cuatro subfamilias (Hanhoff et al., 2002). A pesar del plegado tridimensional común que describen los esqueletos proteicos, las distintas subfamilias muestran características particulares en el tipo de ligandos que unen y en la geometría de unión (Lücke et al., 2003). En la Figura 1.5 se muestran complejos proteína:ligando representando las cuatro subfamilias.

La subfamilia I incluye a las proteínas que unen retinol, CRBPs y las que unen ácido retinoico, CRABPs (Noy, 2000). La subfamilia II presenta a la proteína de unión de ácidos biliares intestinales (I-BABP) y a la FABP de hígado (L-FABP) ambas destacándose por la unión a ligandos inusuales y voluminosos además de los AGs. L-FABP que une un amplio rango de ligandos moleculares (acil-CoAs, hemo, escualeno, bilirrubina y ciertos eicosanoides) (Veerkamp et al., 1991) es la única FABP capaz de formar un complejo con dos moléculas de AG al mismo tiempo (Haunerland et al., 1984). Por otro lado, I-BABP se destaca por su gran afinidad por los ácidos biliares (Sacchettini et al., 1990). La subfamilia III incluye a la FABP de intestino (I-FABP), que une preferentemente AGCL en una conformación aproximadamente lineal, ligeramente curvada (Hodson et al., 1996). La subfamilia IV contiene una gama más diversa de proteínas, entre las que se mencionan A-, B-, E-, H-, M- y T-FABP. Unen con preferencia AGCL en una conformación arqueada en forma de letra U (Lücke et al., 2003).

Si bien en un primer momento las subfamilias de iLBPs surgieron del análisis de las proteínas de mamíferos, aquellas descritas de origen no mamífero (insectos, aves, peces, platelmintos) caen dentro de una de las subfamilias, acreditando la conservación evolutiva considerable de esta familia de proteínas (Haunerland & Spener, 2004).

La distribución de las iLBPs en los distintos tejidos, sus afinidades y especificidades de unión al ligando, la regulación de la expresión y sus estructuras tridimensionales han sido intensamente estudiadas (Storch & Thumser, 2000; Chmurzyńska, 2006; Smathers & Petersen, 2011). En cuanto a las funciones que desempeñan, estas proteínas estarían

implicadas en la captura y transporte intracelular de AGs, así como en la regulación del metabolismo lipídico y protección de la acción deletérea que ejercen los AGCL (Banaszak et al., 1994). Por otra parte, algunos miembros de esta familia participarían en la modulación del crecimiento y proliferación celular. La función específica de cada una de ellas está aún en discusión, siendo objeto de profundas investigaciones (Furahashi & Hotamisligil, 2008; Storch & Córscico, 2008; Glatz & Luiken, 2014).

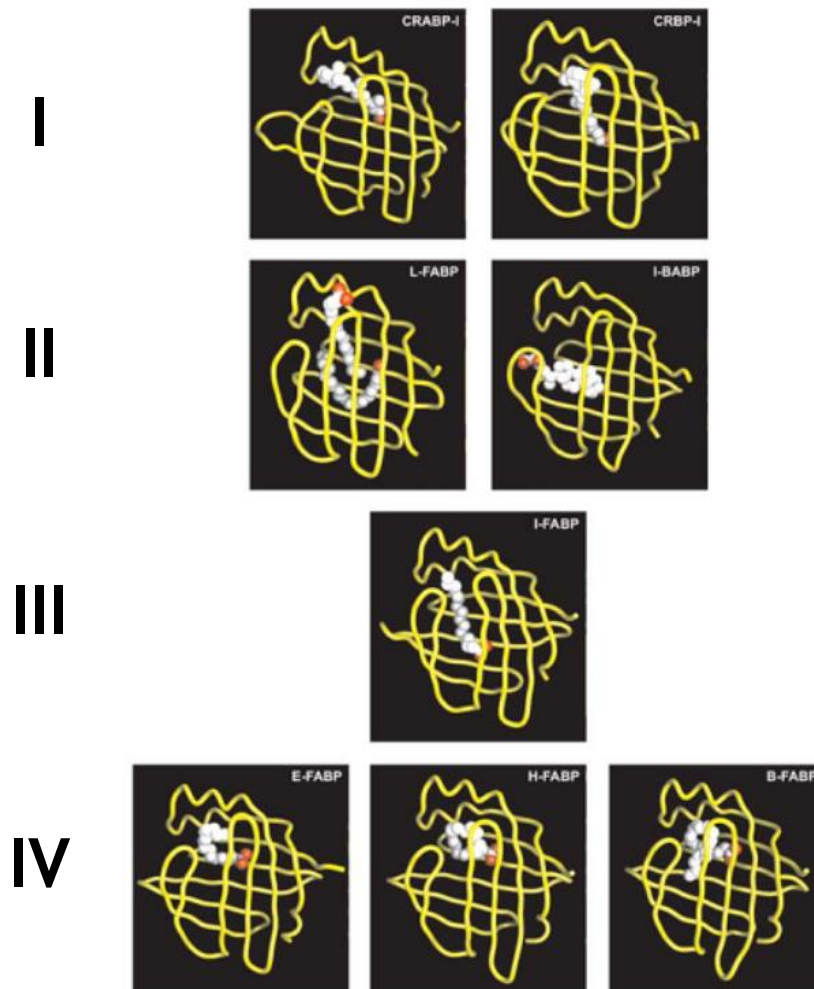


Figura 1.6. Representación gráfica de iLBPs miembros de las cuatro subfamilias. Los cordones en amarillo representan los esqueletos de las proteínas y las esferas, sus respectivos ligandos. (Imagen tomada de Lücke et al., 2003)

A fin de explorar y profundizar en la función de transporte de AGs, se ha recurrido a experimentos *in vitro* a través de ensayos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) con la finalidad de analizar velocidades y mecanismos de transferencia

de AGs con marca fluorescente, desde las proteínas a membranas fosfolipídicas artificiales (Hsu & Storch, 1996). Estos estudios han demostrado que las distintas iLBPs ceden sus ligandos a diversas velocidades y utilizando mecanismos de transferencia claramente diferentes. De esta manera, suele clasificarse a las iLBPs en dos grupos: aquellas en las que la transferencia de ligando implica una interacción de colisión directa con la membrana aceptora, integran el grupo de iLBPs “colisionales”. En contraste, las proteínas que presentan un mecanismo en el cual el paso limitante está relacionado con la disociación del ligando desde la cavidad de la proteína, conforman en grupo de las iLBPs “difusionales” (Figura 1.7).

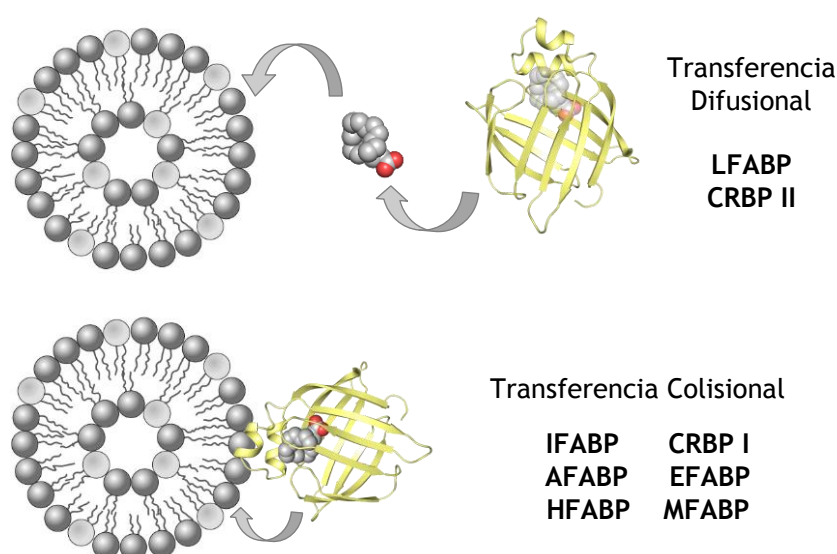


Figura 1.7. Mecanismos de transferencia de ligandos a membranas de las iLBPs. La transferencia de ácidos grasos a partir de LBPs a las membranas puede ocurrir por dos mecanismos diferentes denominados difusional y colisional. (Imagen adaptada de Storch & Thumser, 2000).

1.3 nemFABPs

Los parásitos helmintos producen una variedad de LBPs que se han descubierto en base a su rol inmunodominante en las distintas infecciones (Rodríguez-Pérez et al., 1992; Tree et al., 1995; Barret & Saghir, 1999). Algunas de esas LBPs estarían involucradas en la utilización y transporte de compuestos no solubles, organización estructural e incluso, algunas estarían implicadas en funciones externas especializadas, incluyendo la adquisición y distribución de nutrientes o asistiendo en la producción de huevos (Gobert et al., 1997).

Un grupo de particular interés lo constituyen las nemFABPs (proteínas de nematodos que unen ácidos grasos). Estas proteínas son similares a las FABPs citosólicas, pero presentan un conjunto de características notables y únicas para el *cluster* de nematodos (Kennedy & Harnett, 2001; Michalski et al., 2002). Una de las cualidades extraordinarias presentes en estas proteínas es la existencia de secuencias señales de secreción, determinando su liberación por las células sintetizadoras –en todos los otros casos donde fueron descritas las FABPs, desde insectos hasta humanos, las proteínas están confinadas al citoplasma celular y no son liberadas² (Stewart, 2000)–. De acuerdo a Plenefisch y colaboradores (2000), el grupo de las nemFABPs pudo haberse originado cuando un gen ancestral de FABP adquirió una secuencia señal, con la posterior selección de funciones extracelulares y promoción de variaciones específicas de secuencia que permitiesen una mejor adaptación a dichas funciones.

Los estudios evolutivos reportados sobre LBPs de mamíferos (Materase et al., 1989), LBPs de vertebrados (Medzihradzsky et al., 1992) y LBPs de vertebrados e invertebrados (Schleicher et al., 1995; Shaap et al., 2002) muestran que las proteínas de la subfamilias I y IV tienen un antepasado común que divergió de forma temprana de las iLBPs de las subfamilia II y III. Por otro lado las iLBPs de la subfamilia II presentan una mayor distancia evolutiva respecto a los otros miembros lo cual queda reflejado en sus características de unión a ligandos (Gutiérrez-González, 2002). El cálculo realizado por Matarese et al., (1989) indica que las diferentes subfamilias divergieron a partir de un gen común ancestral hace alrededor de 700 millones de años, previo a la división de vertebrados e invertebrados. En el primer estudio de evolución molecular de iLBPs que incluye una nemFABP, se reporta un árbol evolutivo que mantiene las cuatro ramas de las subfamilias, y una rama adicional, que diverge prematuramente, correspondiente a la única proteína de nematodo incluida, As-p18. En este trabajo se concluye que las cuatro subfamilias se derivan de un gen ancestral que previa duplicación, dio origen a la FABP de *Ascaris suum* (Santomé et al., 1998). La existencia de este nuevo *subcluster* confinado a las FABPs de nematodos es congruente con el posterior estudio de Marcelino et al., (2006) donde analizan 213 secuencias de iLBPs de diversos organismos (incluyendo mamíferos, peces, insectos, trematodos, cestodos y nematodos, entre otros). En este trabajo se muestra una matriz, producto de un análisis múltiple de

² Con el término liberadas, se hace referencia a la vía de externalización clásica mediante el direccionamiento por péptido señal. Existen reportes de FABPs liberadas por una vía secretora no convencional asociado a una función adipoquina (Cao et al., 2013).

semejanza de secuencias, donde puede apreciarse el agrupamiento de las proteínas de nematodos en un *cluster* separado que presenta escasa relación con otras iLBPs. Recientemente el análisis de un árbol bayesiano conteniendo 34 FABPs de invertebrados vuelve a situar a las proteínas de nematodos en clados lejanos (Zheng et al., 2013).

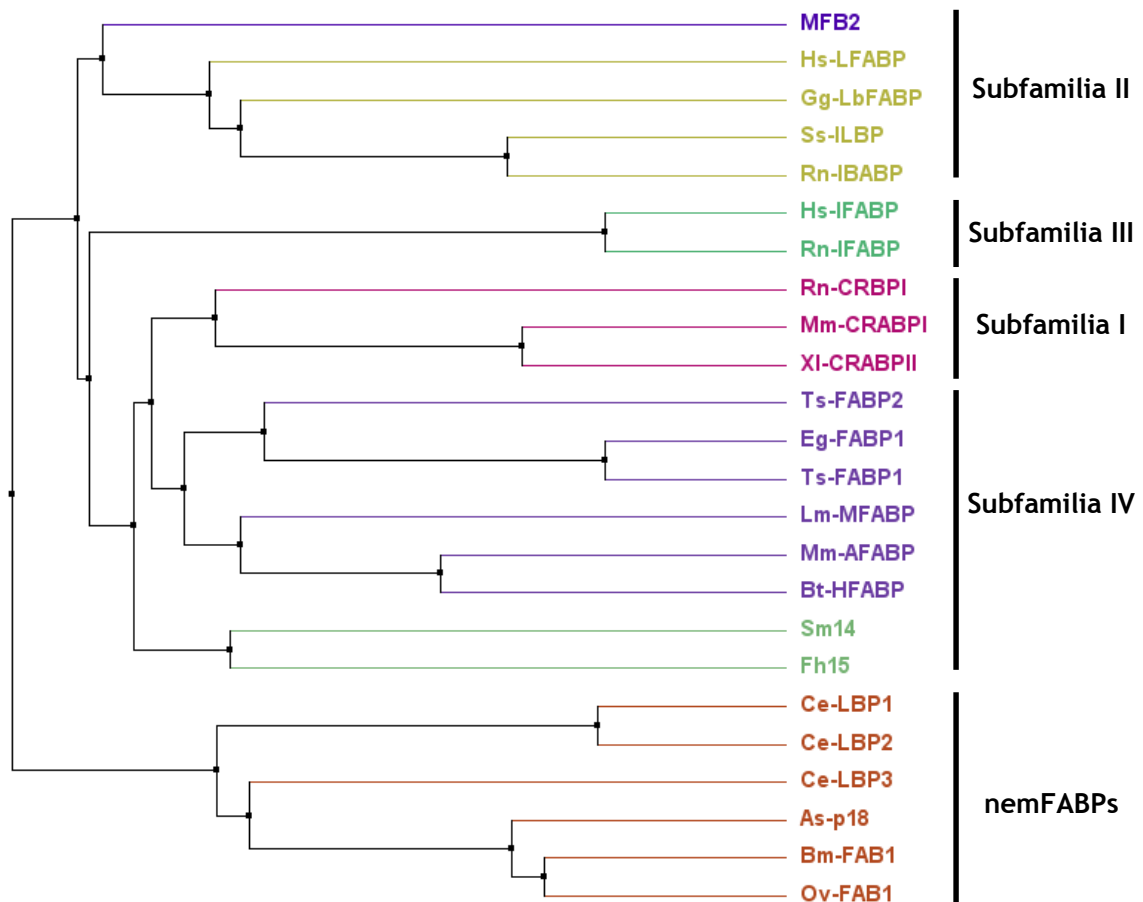


Figura 1.8. Dendrograma a partir del alineamiento múltiple de iLBPs. Se incluyeron 24 proteínas de una amplia gama de organismos. El alineamiento múltiple se realizó con *MUSCLE* y el dendrograma se construyó con el método de distancia media y una matriz de porcentaje de identidad en *Jalview*.

Para ilustrar el patrón de *cluster* de las nemFABPs en la Figura 1.8 se muestra un dendrograma de distancia media para el cual se usó una matriz de porcentaje de identidad en el programa *Jalview* (Waterhouse et al., 2009). El dendrograma se construyó en base a un alineamiento múltiple de 24 secuencias de iLBPs utilizando el programa *MUSCLE* (Edgar, 2004). Las secuencias, provenientes de una amplia variedad de organismos, se seleccionaron a partir del trabajo de Marcelino et al. (2006), con

modificaciones para asegurar la representatividad de las subfamilias. La nomenclatura de cada proteína denota la especie de origen y/o el nombre que le fuera adjudicado originalmente. Las fuentes y códigos de proteína se informan en el Apéndice K.

Una comparación de secuencias de As-p18 con otras nemFABPs, e incluyendo a una FABP de las que presentan mayor porcentaje de identidad de secuencia por fuera del *cluster* de las proteínas de nematodos, revela algunos elementos peculiares del mismo. Como se ve en la Figura 1.9, si bien hay residuos conservados (especialmente en el primer tercio de *todas* las secuencias), se aprecia que a diferencia de lo que ocurre para el resto de las FABPs, donde la longitud de secuencia varía muy poco alrededor de los 130 aminoácidos, las de las nemFABPs son generalmente 10-16 residuos más largas. Esto se manifiesta en las inserciones, que de acuerdo a posteriores análisis, estarían ubicadas en *loops* que conectan hebras- β .

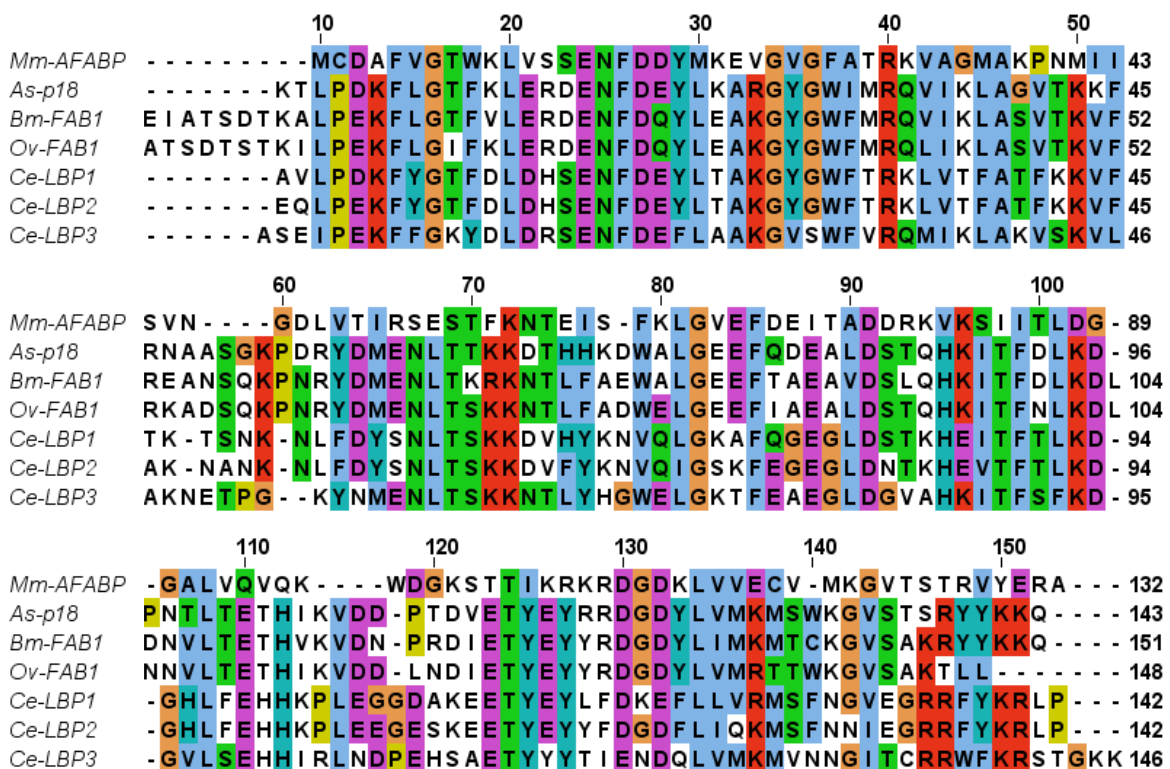


Figura 1.9. Alineamiento de As-p18 con otras nemFABPs y A-FABP de ratón. El alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a las proteínas maduras, se realizó con *MUSCLE*. Posteriormente, desde *Jalview*, se curó de acuerdo a la información estructural recabada durante este trabajo de Tesis a fin de obtener un alineamiento por estructura fiel entre As-p18 y AFABP.

1.4 As-p18

As-p18 fue la primera proteína miembro de la familia de las FABPs para la cual se demostró su secreción (Mei et al., 1997). Desde que se reportó su descubrimiento en 1997 el único artículo en la literatura que estudia a As-p18 es el publicado por Plenefisch et al., (2000). A partir del primer reporte se concluye que As-p18 es una proteína que une ácidos grasos, de síntesis altamente regulada, presente en el líquido perivitelino que rodea a la larva infectiva L3 en los huevos del nematodo *Ascaris suum*. En cuanto al patrón de expresión, mediante *immunoblot* se ha determinado que As-p18 no está presente en los huevos no-embrionados, comienza a sintetizarse aproximadamente al tercer día de desarrollo y llega a ser muy abundante cuando se forma la larva L1 alrededor del día 10. Luego sus niveles se mantienen, revelándose como uno de los componentes más abundantes del fluido perivitelino en los huevos infectivos que contienen a la larva L3. No se detecta a la proteína en otros estadios analizados (L3 recuperada de pulmones de animales infectados, y adultos). El análisis por *northernblot*, sin embargo muestra fehacientemente que el ARNm correspondiente a As-p18 está presente en los huevos no-embrionados, en las larvas L3 recuperadas de animales infectados y en los ovarios de especímenes adultos. Esta discordancia se atribuye a un control a nivel de la traducción. El estudio de Plenefisch, por su parte, mediante el uso coordinado de un sistema modelo *Ascaris / Caenorhabditis*, profundiza sobre el patrón de expresión de As-p18, concluyendo además que se secreta desde la hipodermis de la larva, antes de la formación de la cutícula.

En base a la estructura de la FABP de mayor porcentaje de identidad de secuencia (33% para A-FABP, PDB: 1ADL), Mei y colaboradores, predicen y modelan para As-p18 una estructura del tipo FABP, aunque anticipan que la misma presentaría características inusuales, originadas por las inserciones de varios aminoácidos, evidentes en los alineamientos de secuencias, y por la ausencia de varios residuos muy conservados en la familia. De esta manera, si bien los estudios por modelado muestran que la secuencia de As-p18 se ajusta a una FABP de diez hebras- β organizadas en dos hojas ortogonales, se vislumbran modificaciones en el sitio de unión que podrían estar relacionados a la especificidad del ligando. Además, se predicen segmentos adicionales inusuales expuestos en la superficie de la proteína que podrían estar involucrados en interacciones insospechadas. Más allá de las disparidades a nivel de secuencia primaria, se demuestra que As-p18 es capaz de unir al AG, 18:1 y a un análogo fluorescente con la cinética

normal de las iLBPs. Adicionalmente se descarta la unión a retinol.

Respecto a las posibles funciones desempeñadas por As-p18 se plantean algunas hipótesis interesantes. Por un lado, dado que el comienzo de su expresión se correlaciona con el consumo creciente de triglicéridos dentro del huevo en desarrollo, As-p18 podría ejercer un rol secuestrante para los AGs o sus derivados de peroxidación, potencialmente tóxicos, que se acumularían en torno a la larva. Por otro parte, As-p18 podría estar involucrada en los cambios de permeabilidad que sufre la capa lipóide del huevo al inicio de la eclosión. Dichas perturbaciones en la permeabilidad permiten luego, la difusión de trehalosa por fuera del fluido perivitelino y en consecuencia, el cambio originado en la presión osmótica activaría a la larva quiescente. En conjunto, la actividad de enzimas con los movimientos de la larva desencadenaría la ruptura de la cáscara (Bird & Bird, 1991). Por último, no se descarta que As-p18 pueda estar involucrada en el mantenimiento de la capa lipídica dentro de la estructura de los huevos extraordinariamente resistentes al paso de tiempo y la desecación. En cualquiera de los escenarios propuestos, las características únicas que As-p18 posee pueden reflejar la adaptación a una función específica dentro del huevo.

1.5 Objetivos y Organización de la Tesis

Los objetivos generales del presente proyecto están vinculados al análisis estructural y biofísico de las nemFABPs, con el fin de desarrollar un mejor entendimiento de la relación estructura función, y en última instancia, contribuir a la elucidación de su rol biológico.

El objeto de estudio del trabajo de Tesis es As-p18, una proteína que une ácidos grasos, perteneciente al parásito nematodo *Ascaris suum*. As-p18 presenta la característica extraordinaria de ser liberada por las células que la sintetizan y estudios por modelado prevén modificaciones estructurales presentes en proteínas de nematodos exclusivamente.

Nos proponemos desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- **Purificar la proteína recombinante en un alto grado de pureza, compatible con estudios biofísicos y estructurales.**
- **Obtener el conjunto de estructuras tridimensionales correspondientes a As-**

p18 en solución, empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Para ello, se propone la adquisición y asignación de espectros, cálculos de estructura, posterior refinamiento y validación. Por otra parte, se planea analizar la dinámica de la estructura de As-p18 mediante la adquisición de los parámetros T_1 , T_2 y NOE_{het} .

- **Determinar las propiedades de unión a lípidos de As-p18 empleando métodos bioquímicos y biofísicos. Evaluar la capacidad de unión a ligandos hidrofóbicos, su afinidad por los mismos y la estequiometría del /los complejos obtenidos. Evaluar la capacidad de transferencia de ligandos hacia membranas aceptoras y caracterizar los factores que modulan la velocidad con que ocurre dicho proceso.**

La presente Tesis se organiza en nueve capítulos. En el presente Capítulo 1 de introducción se procura contextualizar el objeto de estudio, brindando un resumen de algunos conceptos relevantes para la Tesis. El Capítulo 2 extracta fundamentos teóricos necesarios para una mejor comprensión de los resultados de RMN. En el Capítulo 3 se resumen las labores desarrolladas para cumplir el primer objetivo de este trabajo que implicó la obtención de proteína recombinante. El Capítulo 4 detalla la determinación de la estructura en solución de As-p18 por RMN. Los aspectos sobre la dinámica de la proteína, analizados por esta técnica, se comentan en el Capítulo 5. El Capítulo 6 describe exhaustivamente la estructura tridimensional y analiza la posibilidad de modelar otras nemFABPs en base al plegamiento que presenta As-p18. Los estudios bioquímicos y biofísicos que caracterizan las propiedades de unión de la proteína se incluyen en el Capítulo 7. En el Capítulo 8 se resumen las conclusiones presentadas en forma parcial a lo largo de los capítulos previos y se presentan algunas perspectivas. Finalmente, en el Capítulo 9 se encuentran los Apéndices con material complementario al que se refiere en algunas secciones, que incluye además, un resumen del trabajo realizado con otras nemFABPs en una etapa temprana de la Tesis.

1.6 Bibliografía

Altcheh J, Fernández G, Guarnera EA, Gutiérrez N, Pizzi H, Taranto N. (2007) Geohelminthiasis en la República Argentina. Boletín PROAPS - REMEDIAR.

Buenos Aires. Ministerio de Salud de la Nación 2007: 53-55.

- Baird S, Kremer M, Hicks JH, Miguel E. (2011) Worms at Work: Long-run Impacts of Child Health Gains. Mimeo, University of California, Berkeley.
- Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. (1994) Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem* 45:89-151.
- Barrett J, Ward CW, Fairbairn D. (1970) The glyoxylate cycle and the conversion of triglycerides to carbohydrates in developing eggs of *Ascaris lumbricoides*. *Comp Biochem Physiol* 35(3):577-586.
- Barrett J. (1976) Studies on the induction of permeability in *Ascaris lumbricoides* eggs. *Parasitology* 73(1):109-21.
- Barrett J, Saghir N. (1999) Lipid binding proteins in parasitic helminths. *Res Rev Parasitol* 59 (3-4):107-112.
- Beames CG Jr, Harris BG, Hopper FA Jr. (1967) The synthesis of fatty acids from acetate by intact tissue and muscle extract of *Ascaris lumbricoides suum*. *Comp Biochem Physiol* 20(2):509-21.
- Behm CA. (1997) The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int J Parasitol* 27(2):215-29.
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. (2006) Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 367(9521):1521-32.
- Bird AF, Bird J. (1991) The structure of nematodes. 2nd Ed. San Diego, CA, Academic Press.
- Botero D, Restrepo M. (2003) Parasitosis intestinales por nematodos. *Parasitosis humanas*. 4ta ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas 2003: 93-105.
- Brownell SA, Nelson KL. (2006) Inactivation of single-celled *Ascaris suum* eggs by low-pressure UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 72(3):2178-84.
- Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, Burak MF, Mayers JR, White A, Inouye K, Rickey LM, Ercal BC, Furuhashi M, Tuncman G, Hotamisligil GS. (2013) Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab* 17(5):768-78.
- Chmurzyńska A. (2006) The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 47(1):39-48.
- Crompton DW, Nesheim MC. (2002) Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr* 22:35-59.
- Cruz LM, Allanson M, Kwa B, Azizan A, Izurieta R. (2012) Morphological changes of *Ascaris* spp. eggs during their development outside the host. *J Parasitol* 98(1):63-8.
- Cruz-Reyes A, Camargo-Camargo B. (2001) Glosario de términos en parasitología y ciencias afines. Instituto de Biología, Programa Universitario de Investigación en Salud, Universidad Nacional Autónoma de México, y Plaza y Valdés Editores. México, DF. 347 pp.
- Dold C, Holland CV. (2011) *Ascaris* and ascariasis. *Microbes Infect* 13(7):632-7.
- Dutto M, Petrosillo N. (2013) Hybrid *Ascaris suum/lumbricoides* (ascarididae) infestation in a pig farmer: a rare case of zoonotic ascariasis. *Cent Eur J Public Health* 21(4):224-6.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-1797.
- Esteves A, Ehrlich R. (2006) Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142(3-4):262-74.
- Fagerholm HP, Nansen P, Roepstorff A, Frandsen F, Eriksen L. (2000) Differentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg. *J Parasitol* 86(3):421-7.
- Fairbairn D. (1955) Embryonic and post-embryonic changes in the lipids of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Can J Biochem Physiol* 33(2):122-9.
- Fairbairn D. (1957) The biochemistry of *Ascaris*. *Exp Parasitol* 6(5):491-554.
- Furuhashi M, Hotamisligil GS. (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7(6):489-503.
- Furukawa Y, Yamamoto T, Kimura S, Hayashi H, Oya H. (1985) Biosynthesis of lipids during embryogenesis of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Tohoku J Exp Med* 147(3):221-34.
- Gállego Berenguer J. (2007). Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Madrid: Ediciones Díaz de Santos. 516 pp.
- Gamboa MI, Kozubsky LE, Costas ME, Garraza M, Cardozo MI, Susevich ML. (2009). Asociación entre geohelminths y condiciones socioambientales en

diferentes poblaciones humanas de Argentina. Rev Panam Salud Pública 26(1):1–8.

Geenen PL, Bresciani J, Boes J, Pedersen A, Eriksen L, Fagerholm HP, Nansen P. (1999) The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. J Parasitol 85(4):616–22.

Geng J, Plenefisch J, Komuniecki PR, Komuniecki R. (2002) Secretion of a novel developmentally regulated chitinase (family 19 glycosyl hydrolase) into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. Mol Biochem Parasitol 124(1–2):11–21.

Glatz JF, Luiken JJ. (2014) Fatty acids in cell signaling: Historical perspective and future outlook. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids pii: S0952-3278(14)00043-X.

Gobert GN, Stenzel DJ, Jones MK, McManus DP (1997) Immunolocalisation of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult *Schistosoma japonicum*. Parasitology 115, 33–39.

Gutiérrez González LH. (2002). Structural and dynamical studies on human epidermal-type fatty acid binding protein using high resolution NMR spectroscopy. Doctoral Thesis. Univ.-Bibliothek Frankfurt am Main. Johann Wolfgang Goethe-University. urn:nbn:de:hebis:30-0000000722.

Guyatt H. (2000) Do intestinal nematodes affect productivity in adulthood? Parasitol Today 16(4):153–8.

Hanhoff T, Lücke C, Spener F. (2002) Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. Mol Cell Biochem 239(1–2):45–54.

Haunerland N, Jagschies G, Schulenberg H, Spener F. (1984) Fatty-acid-binding proteins. Occurrence of two fatty-acid-binding proteins in bovine liver cytosol and their binding of fatty acids, cholesterol, and other lipophilic ligands. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 365(3):365–76.

Haunerland NH, Spener F. (2004) Properties and physiological significance of fatty acid-binding proteins. Adv Mol Cell Biol 33: 99–122.

Hodsdon ME, Ponder JW, Cistola DP. (1996) The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. J Mol Biol 264(3):585–602.

Hsu KT, Storch J. (1996) Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. J Biol Chem 271(23):13317–23.

Jezyk PF, Fairbairn D. (1969) Quantitative aspects of lipid utilization during embryogenesis of *Ascaris suum* eggs. J Parasitol 55(3):477–9.

Khanna DP, Yadav PR. (2004) Biology of helminthes. New Delhi: Discovery Publishing House. 456p.

Kennedy M, Harnett W. (2001) Parasitic nematodes: Molecular biology, biochemistry and immunology. CABI publishing. ISBN 0-85199-423-7. xxiii + 486p.

Kim MK, Pyo KH, Hwang YS, Park KH, Hwang IG, Chai JY, Shin EH. (2012) Effect of temperature on embryonation of *Ascaris suum* eggs in an environmental chamber. Korean J Parasitol 50(3):239–42.

Komuniecki RW, Tielens AGM. (2003) Carbohydrate and energy metabolism in parasitic helminths. In: Molecular medical parasitology (eds Marr JJ, Nilsen TW, Komuniecki RW). Amsterdam, Academic Press; p 339–358.

Lee SH, Song CY, Lee KB, Lee HS. (1977) A study on the lipids of *Ascaris suum* ova. Kisaengchunghak Chapchi 15(1):43–50.

Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A. (2012) Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? Parasit Vectors 5:42.

Londraville RL. (1996) Intracellular fatty acid-binding proteins: putting lower vertebrates in perspective. Braz J Med Biol Res 29(6):707–20.

Lücke C, Gutierrez-Gonzalez H, Hamilton JA. (2003) Intracellular lipid binding proteins: evolution, structure, and lipid binding. In: Cellular proteins and their fatty acids in health and disease (eds. Dutta-Roy A & Spener F). Weinheim, Germany: Wiley VCH; p. 95–114.

Lücke C, Qiao Y, van Moerkerk HT, Veerkamp JH, Hamilton JA. (2006) Fatty-acid-binding protein from the flight muscle of *Locusta migratoria*: evolutionary variations in fatty acid binding. Biochemistry 45(20):6296–305.

Marcelino AM, Smock RG, Gierasch LM. (2006) Evolutionary coupling of structural and functional sequence information in the intracellular lipid-binding protein family. Proteins 63(2):373–84.

Matarese V, Stone RL, Waggoner DW, Bernlohr DA. (1989) Intracellular fatty acid trafficking and the role of cytosolic lipid binding proteins. Prog Lipid Res 28(4):245–72.

Medzihradszky KF, Gibson BW, Kaur S, Yu ZH, Medzihradszky D, Burlingame AL, Bass NM. (1992) The primary structure of fatty-acid-binding protein

from nurse shark liver. Structural and evolutionary relationship to the mammalian fatty-acid-binding protein family. *Eur J Biochem* 203(3):327-39.

Mei B, Kennedy MW, Beauchamp J, Komuniecki RP, Komuniecki R. (1997) Secretion of a novel developmentally regulated fatty acid binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 272: 9933-9941.

Michalski ML, Monsey JD, Cistola DP, Weil GJ. (2002) An embryo-associated fatty acid-binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 124(1-2):1-10.

Miguel EA, Kremer M. (2003) Worms: identifying impacts on education and health in the presence of treatment externalities. *Econometrica* 72: 159-217.

Murrell KD, Eriksen L, Nansen P, Slotved HC, Rasmussen T. (1997) *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. *J Parasitol* 83(2):255-60.

Navarro FA. (2011) Infección e Infestación. Laboratorio del Lenguaje. Blog de la comunidad médica de habla hispana. <http://medicablogs.diariomedico.com/laboratorio/2011/05/18/al-pan-pan-6/>

Noy N. (2000) Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 15:348 Pt 3:481-95.

Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. (1972) A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 177(4043):56-8.

O'Lorain P, Holland CV. (2000) The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology* 121 Suppl:S51-71.

PAHO Pan American Health Organization (2009). Epidemiological Profiles for Neglected Diseases and Other Infections Related to Poverty in Latin America and the Caribbean.

Passey RF, Fairbairn D. (1957) The conversion of fat to carbohydrate during embryonation of ascaris eggs. *Can J Biochem Physiol* 35(7):511-25.

Peng W, Criscione CD. (2012) Ascariasis in people and pigs: New inferences from DNA analysis of worm populations. *Infect Genet Evol* 12:227e35

Perry RN, Moens M. (2011) Survival of parasitic nematodes outside the host. In: Molecular and physiological basis of nematode survival. (eds. Perry RN & Wharton DA). CABI Publishing, Wallingford; p. 1-22.

Plenefisch J, Xiao H, Mei B, Geng J, Komuniecki P, Komuniecki R. (2000) Secretion of a novel class of iFABPs in nematodes: coordinate use of the *Ascaris* /*C. elegans* model systems. *Mol Biochem Parasitol* 105:223-236.

Quilès F, Balandier JY, Capizzi-Banas S. (2006) In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. *Anal Bioanal Chem* 386(2):249-55.

Rodríguez-Pérez J, Rodríguez-Medina JR, García-Blanco MA, Hillyer GV. (1992). *Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Exp Parasitol* 74(4):400-7.

Rogers RA. (1956) A study of eggs of *Ascaris lumbricoides* var. *suum* with the electron microscope. *J Parasitol* 42(2):97-108.

Saboyá MI, Catalá L, Nicholls RS, Ault SK. (2013) Update on the mapping of prevalence and intensity of infection for soil-transmitted helminth infections in Latin America and the Caribbean: a call for action. *PLoS Negl Trop Dis* 7(9):e2419.

Sacchetti JC, Hauft SM, Van Camp SL, Cistola DP, Gordon JL. (1990) Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. *J Biol Chem* 265(31):19199-207.

Santomé JA, Di Pietro SM, Cavagnari BM, Córdoba OL, Dell'Angelica EC. (1998) Fatty acid binding proteins. Chronological description and discussion of hypotheses involving their molecular evolution. *Trends Comp Biochem Physiol* 4:23-38.

Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF. (2002) Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem* 239(1-2):69-77.

Schleicher CH, Córdoba OL, Santomé JA, Dell'Angelica EC. (1995) Molecular evolution of the multigene family of intracellular lipid-binding proteins. *Biochem Mol Biol Int* 36(5):1117-25.

Schüle SA, Clowes P, Kroidl I, Kowuor DO, Nsojo A, Mangu C, Riess H, Geldmacher C, Laubender RP, Mhina S, Maboko L, Löscher T, Hoelscher M, Saathoff E. (2014) *Ascaris lumbricoides* infection and its relation to environmental factors in the Mbeya region of Tanzania, a cross-sectional, population-based study. *PLoS One* 9(3):e92032.

Sengupta ME. (2012) Sedimentation and resuspension of helminth eggs in water. Ph.D. thesis, Department of Veterinary Disease Biology, University

of Copenhagen.

Sherman DR, Kloek AP, Krishnan BR, Guinn B, Goldberg DE. (1992) Ascaris hemoglobin gene: plant-like structure reflects the ancestral globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24):11696-700.

Smathers RL, Petersen DR. (2011) The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics* 5(3):170-91.

Socias ME, Fernández A, Gil JF, Krolewiecki AJ. (2014) Geohelmintiasis en la Argentina: Una revisión sistemática. *MEDICINA (Buenos Aires)* 74: 29-36.

Storch J, Thumser AE. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1486(1):28-44.

Storch J, Corsico B. (2008) The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 28:73-95.

Storch J, Thumser AE. (2010) Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *J Biol Chem* 285(43):32679-83.

Stewart JM. (2000). The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting. *Cell Mol Life Sci Sep*;57(10):1345-59.

Tree TI, Gillespie AJ, Shepley KJ, Blaxter ML, Tuan

RS, Bradley JE. (1995) Characterisation of an immunodominant glycoprotein antigen of *Onchocerca volvulus* with homologues in other filarial nematodes and *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol* 69(2):185-95.

Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. (1991) Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1081(1):1-24.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9):1189-91.

World Health Organization. (1987) Public health significance of intestinal parasitic infections. *Bulletin of the World Health Organization* 65 (5): 575-588.

World Health Organization. (2010) First WHO report on neglected tropical diseases 2010: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization.

Wharton D. (1980) Nematode egg-shells. *Parasitology* 81(2):447-63.

Zheng Y, Blair D, Bradley JE. (2013) Phyletic distribution of fatty acid-binding protein genes. *PLoS One* 8(10):e77636.

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

2. Fundamentos Teóricos

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

2. Fundamentos Teóricos

2.1 Introducción

Las técnicas derivadas de RMN resultan de gran utilidad para la caracterización estructural de biomacromoléculas de manera complementaria a la cristalografía de rayos X, pero con la extraordinaria capacidad de brindar información sobre la dinámica de las moléculas (Kay, 2005; Wuthrich et al., 1990). A continuación se resumen algunos de los aspectos teóricos subyacentes.

Ciertos núcleos poseen la propiedad de alinearse respecto a un campo magnético aplicado, de manera tal que pueblan diferentes estados, con distintas energías asociadas. Los núcleos que poseen esta capacidad se denominan espines y la misma viene determinada por el número cuántico I . Desde el punto de vista práctico, los núcleos estudiados por RMN son aquellos con $I = \frac{1}{2}$. En la química de proteínas cumplen con esta condición los núcleos de ^1H , ^{15}N y ^{13}C , si bien los dos últimos isótopos no son abundantes en la naturaleza. La excitación de estos espines por medio de un pulso de radiofrecuencia que coincida con la diferencia de los estados energéticos, provoca una absorción de energía que finalmente origina la señal de RMN (Figura 2.1). Este es el principio fundamental de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.

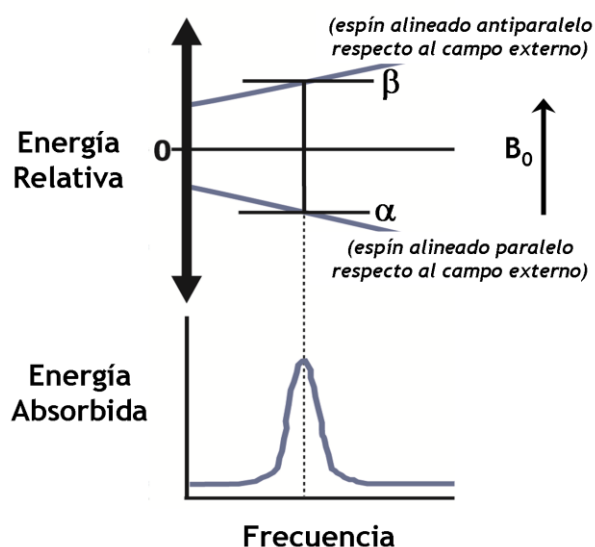


Figura 2.1. Niveles de energía en presencia de un campo magnético externo, B_0 . En estas condiciones los espines con $I = \frac{1}{2}$ pueden poblar dos estados energéticos distintos. Si se perturba el sistema con una radiofrecuencia que coincida con la diferencia de energía de los dos estados, se produce una transición evidenciada por la señal de RMN.

En el estudio de sistemas macromoleculares como las proteínas, donde hay de varios cientos a miles de núcleos de hidrógeno, resulta imprescindible recurrir a los experimentos multidimensionales heteronucleares que permitan superar los problemas de superposición de señales y de complejidad de asignación. De allí surge la necesidad de que las muestras se enriquezcan en los isótopos visibles para RMN, ^{13}C y ^{15}N . Los experimentos multidimensionales de RMN recaban información combinada de varios núcleos acoplados en la proteína y constan de una secuencia de pulsos y tiempos de espera organizados en bloques. Por ejemplo, un experimento 2D consta de cuatro etapas sucesivas: preparación, evolución, mezclado y detección (Hore et al., 2000). Durante la preparación se deja al sistema retornar a la situación de equilibrio térmico. Luego se excitan ciertas poblaciones de núcleos mediante pulsos de radiofrecuencias selectivos. Seguidamente durante el período de evolución, t_1 , se deja precesionar libremente a los núcleos excitados con su frecuencia característica (dimensión indirecta). Durante la etapa de mezclado se trasfiere la magnetización entre núcleos acoplados por enlaces covalentes (acoplamiento escalar) o por proximidad en el espacio (acoplamiento dipolar) según el experimento. Finalmente durante la etapa de detección, t_2 , se adquiere la señal conocida como FID (*Free Induction Decay*) que tiene impresa la frecuencia de este último núcleo afectado, pero modulada en función del primero. Al repetir los experimentos con incrementos sistemáticos en t_1 se obtiene una matriz. Finalmente a esta matriz se le aplica una doble transformada de Fourier para dar por resultado un espectro en dos dimensiones con picos de cruce o *crosspeaks* cuyas coordenadas corresponden a los valores de frecuencia de los núcleos acoplados. Las diferencias entre señales provienen de las diferencias entre los entornos químicos que rodean a los núcleos en la molécula, con lo que la señal proporciona información estructural de gran valor (Millet, 2009^a). Las secuencias de pulsos se diseñan en función de las correlaciones y acoplamientos que se quieran investigar.

Tal como se muestra en la Figura 2.2, la determinación estructural de una proteína por RMN sigue un esquema de trabajo que involucra varios pasos. Luego de obtener una muestra de proteína que cumpla con los requisitos de pureza, solubilidad y concentración, se corren distintas baterías de experimentos. Estos deben procesarse a fin de poder interpretar las señales individuales de cada núcleo. El paso siguiente consiste en identificar las resonancias observadas relacionándolas con los núcleos acoplados que las originan. Una vez identificado el mayor número posible de núcleos, se establecen distintos tipos de restricciones que los vinculan geoméricamente. La suma de

restricciones integran los datos de entrada para el programa que realizará el cálculo de estructura. Luego de un proceso iterativo de refinamiento, donde se reevalúan asignaciones y se suma más información estructural, se arriba a un conjunto de estructuras tridimensionales, topológicamente consistente que concuerda con los datos experimentales. Finalmente se somete este conjunto de estructuras a un proceso de validación.

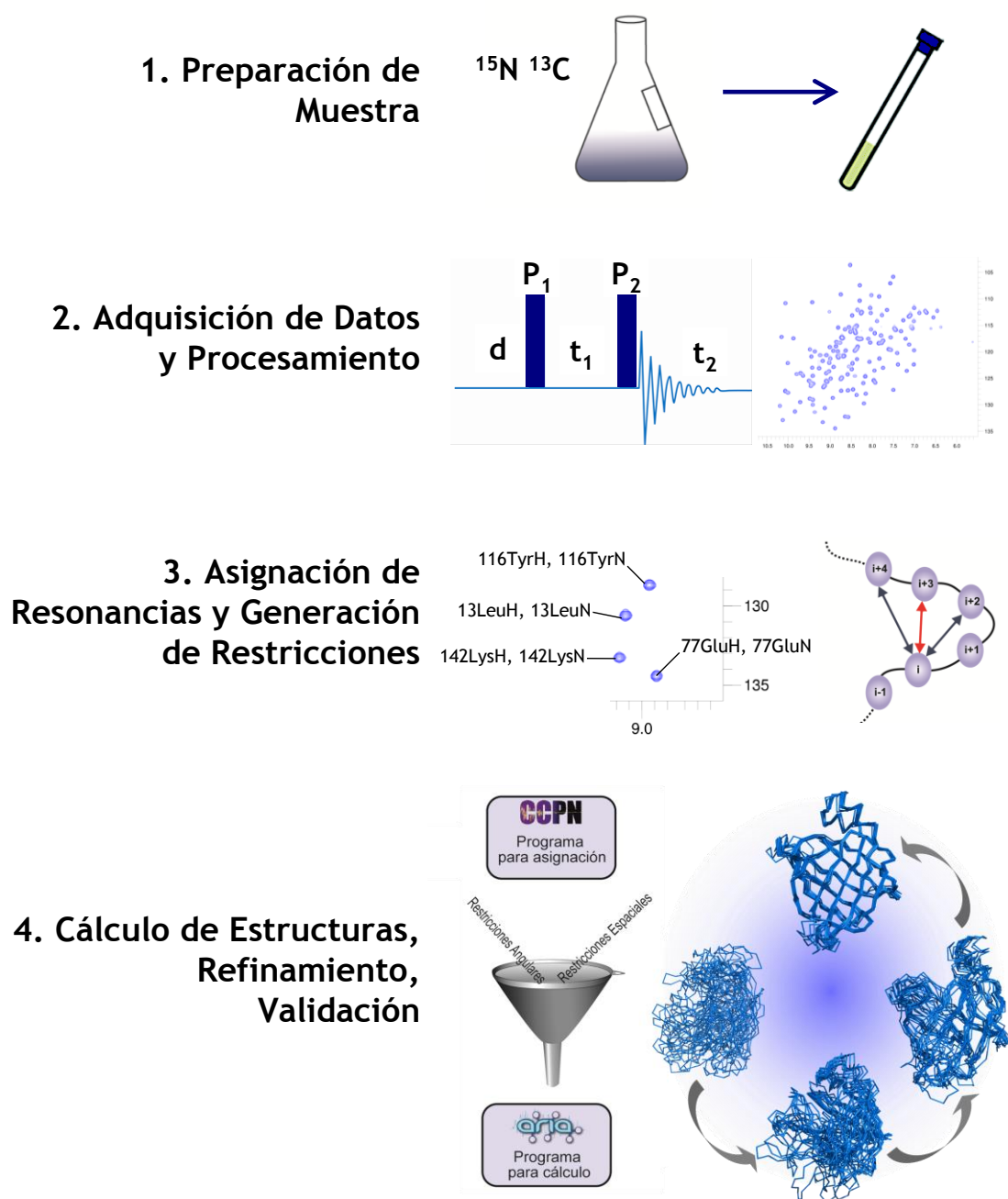


Figura 2.2. Etapas en el proceso de determinación estructural por RMN de una proteína.

Respecto a este esquema de trabajo, en el Capítulo 3 se detalla la labor experimental que permitió obtener una muestra adecuada para la adquisición de espectros. El Capítulo 4 compendia desde la adquisición de datos y procesamiento hasta el proceso final de validación. En las siguientes secciones de este capítulo se examinan los principios teóricos básicos de los métodos aplicados durante la determinación estructural de Asp18 y los estudios de dinámica por RMN, detallados en el Capítulo 5.

2.2 Restricciones de Distancia a partir de NOEs

La determinación estructural de proteínas por RMN implica el uso de restricciones que permiten inferir la posición relativa de todos los átomos que las componen. Si bien existe una gran variedad de clases de restricciones (Güntert, 1998), las de distancias a partir de los Efectos Nucleares Overhauser (NOEs) representan la fuente esencial y más abundante de información estructural en las determinaciones por RMN. Los NOEs son fundamentales para definir la estructura secundaria y terciaria de una proteína debido a que relacionan pares de átomos de hidrógeno separados a una distancia menor a 5 Å, que si bien pueden encontrarse distantes en la secuencia polipeptídica, se hallan próximos en el espacio.

De forma simplificada, el Efecto Nuclear Overhauser radica en que un núcleo i es capaz de modificar los parámetros asociados a la relajación de otro núcleo cercano j , mediante interacciones dipolares, y en consecuencia las señales que este último emite se ven intensificadas o atenuadas. La intensidad de este efecto (I_{ij}) guarda relación con la distancia que separa dichos núcleos i y j (Neuhaus & Williamson, 2000) y con una función de correlación ζ , mediante,

$$I_{ij} \propto (r_{ij})^{-6} \zeta \quad (2.1)$$

donde ζ , depende del tiempo de correlación rotacional, τ_c del vector internuclear.

En un sistema simplificado, se considera que las proteínas globulares son relativamente rígidas y se mueven aleatoriamente con un τ_c constante para todos los pares de protones, de manera que la intensidad de un NOE dado puede correlacionarse directamente con una distancia internuclear.

2.3 Acoplamientos Dipolares Residuales

Los Acoplamientos Dipolares Residuales (RDC) representan una poderosa herramienta para estudiar la estructura y función de macromoléculas en solución. El empleo de

restricciones derivadas de RDCs es complementario al de las proporcionadas por los NOEs (Bax & Grishaev, 2005; Lipsitz & Tjandra, 2004; Gronenborn, 2002). Mientras los NOEs proveen restricciones de distancia locales, los RDCs proporcionan información de orientación de largo alcance y son especialmente importantes en las estructuras con grandes cavidades como las que exhiben las FABPs. Actualmente los RDCs son ampliamente utilizados en el cálculo estructural y su incorporación durante el proceso de refinamiento reporta mejoras tanto en la precisión de las estructuras derivadas, como en la calidad de los mapas de Ramachandran.

Los espines nucleares con momento magnético pueden interactuar a través del espacio mediante interacciones dipolo-dipolo. El acoplamiento dipolar entre dos núcleos A y B está dado por:

$$D_{AB}(\theta) = D_0 (1 - 3 \cos^2 \theta) \quad (2.2)$$

Donde θ es el ángulo entre el enlace internuclear A-B y el campo magnético y D_0 depende de la distancia entre ambos núcleos y de la constante giromagnética de ambos. En solución, las moléculas se mueven aleatoriamente con respecto al campo magnético; esto resulta en que los diferentes acoplamientos que se den en las moléculas se promedien a cero y de allí que el acoplamiento dipolar no se manifieste como un fenómeno directamente observable. Sin embargo, si se elimina de alguna manera la condición de movimiento aleatorio de la proteína respecto al campo magnético, se vería una resultante, producto del acoplamiento dipolar, que de otra manera promedia a cero (Lipsitz & Tjandra 2004). Esta situación puede lograrse introduciendo en el medio alguna sustancia que provoque cierto grado de alineamiento en las moléculas proteicas, restringiendo levemente su movimiento. Experimentalmente se recurre a micelas, fagos o geles, entre otros, para crear ese medio anisotrópico.

Para dos núcleos acoplados, A y B en una molécula que se mueve aleatoriamente en una solución anisotrópica, el acoplamiento dipolar observado D_{AB} , se puede escribir como:

$$D_{AB}(\theta, \varphi) = A_a^{AB} \{ (3 \cos 2\theta - 1) + 3/2 R (\sin^2 \theta \cos 2\phi) \} \quad (2.3)$$

Donde A_a^{AB} y R son los componentes axial y rómbico, respectivamente, del tensor de alineamiento **A**; θ es el ángulo entre el vector del enlace A-B y el eje z del tensor de

alineación. ϕ es el ángulo entre la proyección del vector internuclear A-B entre el plano x-y y el eje x. A_a^{AB} es igual a:

$$A_a^{AB} = -\left(\frac{\mu_0 h}{16\pi^3}\right) S_{\gamma_A \gamma_B} \langle r_{AB}^{-3} \rangle A_a \quad (2.4)$$

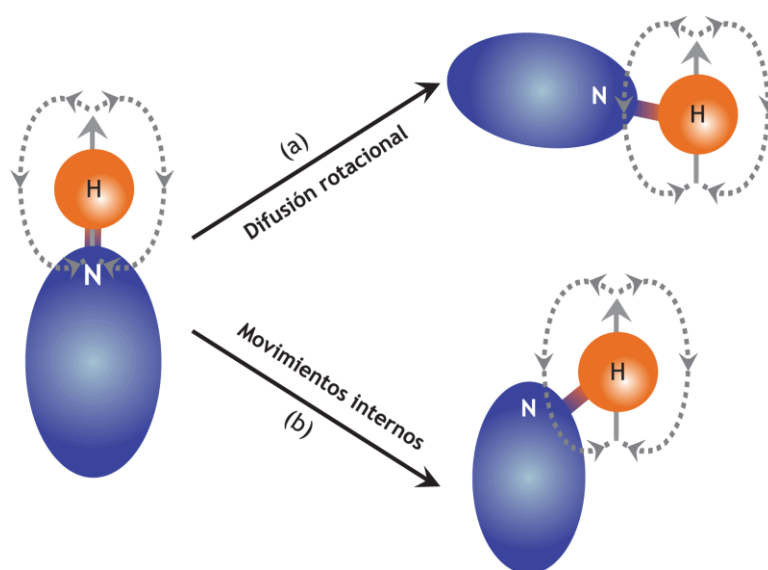
Donde μ_0 es la permeabilidad del vacío, h es la constante de Plank, S es el parámetro de orden, γ_A y γ_B son las constantes giromagnéticas de los núcleos A y B, respectivamente y A_a es el componente axial del tensor de alineamiento. Cuando se observa un solo tipo de acoplamiento dipolar, (como en este trabajo de Tesis, entre los núcleos N-H) casi todos los valores se mantienen constantes, siendo los ángulos θ y ϕ los únicos que afectan los RDC (es decir, la orientación del vector internuclear N-H con respecto al tensor de alineación).

2.4 De la Relajación a la Dinámica

La dinámica de las proteínas es un aspecto importante de la relación estructura-función presente en muchos procesos bioquímicos. Las técnicas de RMN, además de brindar información estructural con resolución atómica, son de gran utilidad para el estudio de los procesos dinámicos. A partir de diversos experimentos, puede explorarse un amplio rango de escalas de tiempo en las que tienen lugar los movimientos moleculares y analizarlos de forma separada. Por otra parte, es posible analizar estos movimientos de manera individual, residuo-específica en la proteína.

El análisis de la dinámica de proteínas por RMN comienza evaluando los fenómenos de relajación de sus espines. La relajación es el proceso por el cual los espines retornan al equilibrio térmico. Desde un punto de vista fenomenológico el retorno al equilibrio está caracterizado por las constantes de tiempo T_1 y T_2 (Hornak, 1996). La primera describe la relajación longitudinal que tiene lugar cuando se dan transiciones entre estados de espín; también es llamada espín-red (*spin-lattice relaxation*), ya que implica transferencia de energía entre el sistema de espines y su entorno. T_2 es la constante de tiempo que describe la relajación transversal, durante la cual se produce la pérdida de coherencia en el movimiento de precesión de los espines, que es la que origina la anchura de línea espectral. La relajación transversal también suele conocerse como relajación espín-espín (*spin-spin relaxation*) ya que se da por interacciones entre espines. Así, para un núcleo de espín $1/2$, T_1 y T_2 son los observables independientes que

describen el fenómeno de la relajación (Millet, 2009^b; Pons, 2005). En cuanto al origen de la relajación en un determinado núcleo de una molécula sometida a un campo magnético, ésta se debe a las fluctuaciones de los dipolos magnéticos que rodean a ese núcleo. En disolución, la velocidad de estas fluctuaciones es consecuencia tanto del movimiento aleatorio de la molécula (rotaciones, en particular), como de los movimientos internos (Figura 2.3). Por lo tanto, la relajación en solución está estrechamente relacionada con la dinámica de los núcleos y, en consecuencia, proporcionan información acerca de la movilidad de cada residuo (Keeler, 2005). Los mecanismos por los cuales un núcleo puede relajarse son diversos, pero para los de espín $\frac{1}{2}$, y en particular para el heteronúcleo que usualmente se estudia (^{15}N) los más importantes son las interacciones dipolares y la anisotropía de desplazamiento químico (CSA). Esta última es el resultado de una distribución electrónica asimétrica alrededor del núcleo considerado. Por su parte, la interacción dipolar depende principalmente de la distancia entre los núcleos y la relación angular entre el campo magnético y el vector internuclear. Como se comentó previamente, este acoplamiento no se observa en solución, ya que promedia a cero por los movimientos aleatorios de la molécula. Sin embargo, a medida que la molécula se mueve, el acoplamiento dipolo-dipolo va cambiando constantemente al cambiar las relaciones vectoriales, generando un campo magnético fluctuante en cada núcleo. El efecto Nuclear Overhauser es de hecho, una consecuencia directa del acoplamiento dipolar. Así, las medidas de los NOEs no son más que las medidas de la relajación cruzada inducida por la interacción dipolar.



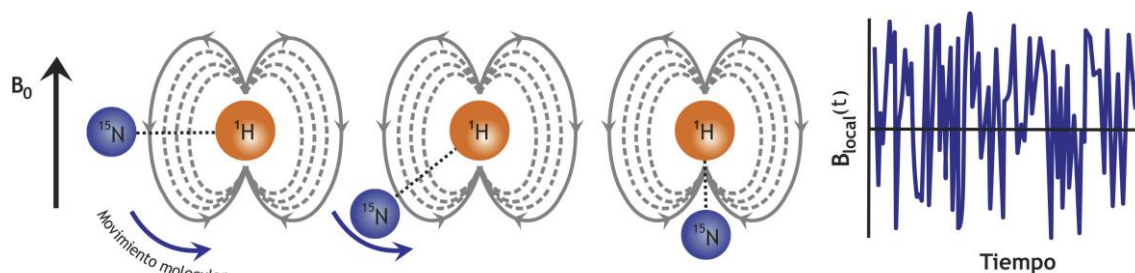


Figura 2.3. Contribuciones a la relajación de los núcleos debida a los movimientos aleatorios de la molécula e internos. Como se muestra en la parte inferior, los distintos movimientos moleculares modulan la frecuencia de oscilación del campo magnético que sensa (B_{local}) un determinado núcleo. La imagen inferior se adaptó de Bothe et al., 2011.

Hay un concepto más a tener en cuenta para relacionar la relajación de los núcleos con su dinámica y es el tiempo de correlación, τ_m . Este se define como el tiempo medio que una molécula (o vector internuclear si hablamos de τ_c) tarda en girar un radián. Es una magnitud que habla de la velocidad con que se reorienta una molécula en solución y en consecuencia, está estrechamente relacionada con la frecuencia de las oscilaciones de los campos magnéticos generados. Depende de varios factores entre los que se destacan la forma y el tamaño de la proteína (también influyen la viscosidad del medio y la temperatura). Relacionando el tiempo de correlación con los procesos de relajación, estos serán más eficientes cuando las frecuencias de oscilación en el campo magnético coincidan con la diferencia de energía entre dos estados de espín. Como se muestra en la Figura 2.4 en el caso de la relajación longitudinal, T_1 será menor (y la velocidad $R_1 = T_1^{-1}$, mayor) para las frecuencias cercanas a la frecuencia de Larmor del núcleo en cuestión, lo que explica que muestre un mínimo en la gráfica. Las velocidades de relajación cruzada ^1H - ^{15}N (evaluadas a través del NOE heteronuclear en estado estacionario) representan el parámetro más sensible en la escala de los nanosegundos, exhibiendo valores positivos para moléculas grandes que se mueven más lentamente y moviéndose abruptamente a intensidades negativas para moléculas pequeñas con τ_m cortos. La relajación transversal se afecta tanto por frecuencias cercanas a la de Larmor, como por las cercanas a 0 Hz, de manera tal que T_2 , a diferencia de T_1 , continúa disminuyendo (o sea que su velocidad $R_2 = T_2^{-1}$, aumenta) a medida que τ_m aumenta (Vance, 2012).

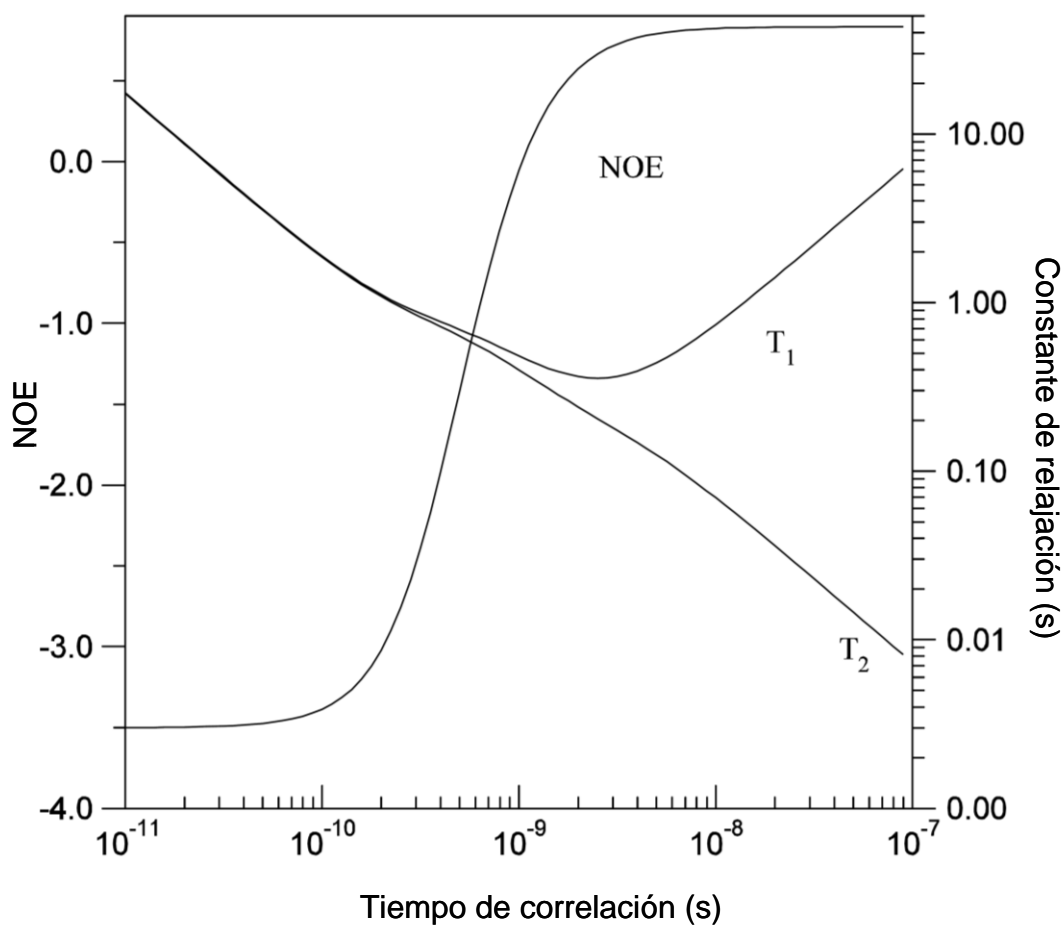


Figura 2.4. Relación entre T_1 , T_2 , ^{15}N NOE y el tiempo de correlación en un campo de 14.1 Tesla. Gráfico suministrado por el Dr. Brian Smith (University of Glasgow).

2.5 Formalismo *Model Free*

En el presente trabajo de Tesis se analizaron solamente las propiedades de relajación de las amidas peptídicas debido a la simplicidad de cálculo y a que proveen información dinámica de prácticamente todos los residuos de la proteína.

El campo magnético observado por un núcleo ^{15}N , debido a sus protones vecinos, fluctúa a causa del movimiento de rotación de toda la proteína y de los movimientos locales. La función de densidad espectral $J(\omega)$ describe cómo afectan las fluctuaciones de diferentes frecuencias a la relajación de un núcleo dado (Jiménez Garrido, 2003). La contribución que un campo fluctuante de una determinada frecuencia, ω , proporciona a la relajación nuclear depende también de los movimientos moleculares globales según la siguiente ecuación:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (2.5)$$

donde τ_c es el tiempo de correlación para el movimiento considerado.

La relajación de las amidas peptídicas pueden definirse en base a las funciones de densidad espectral mediante los siguientes parámetros (Abragam, 1994):

$$R_1 = (d^2/4)[J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N) + c^2J(\omega_N)] \quad (2.6)$$

$$R_2 = (d^2/8)[4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + (c^2/6)[4J(0) + 3J(\omega_N)] + R_{ex} \quad (2.7)$$

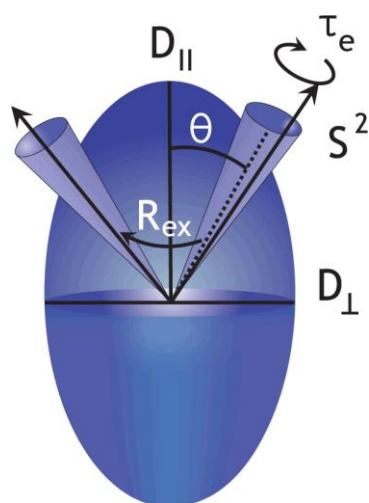
$$NOE = 1 + (d^2/4R_1)(\gamma_N/\gamma_H)[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] \quad (2.8)$$

donde $d = \frac{\mu_0 h \gamma_N \gamma_H \langle r_{NH}^{-3} \rangle}{8\pi^3}$, $c = \omega_N \Delta\sigma/\sqrt{3}$, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío, h es la constante de Planck, ω_H y ω_N son las frecuencias de Larmor de los espines 1H y ^{15}N , respectivamente; γ_H y γ_N son las respectivas constantes giromagnéticas; y $\Delta\sigma$ es la anisotropía de corrimiento químico del ^{15}N colinear con el vector N-H. El término R_{ex} se incluye para dar cuenta de los procesos de intercambio químico que contribuyen al decaimiento de la magnetización transversal.

Para la amplitud y las escalas de tiempo de los movimientos intramoleculares Lipari y Szabo desarrollaron un formalismo que explica, con el menor número de suposiciones posibles, los movimientos rápidos internos en una proteína (Lipari & Szabo, 1982^{a/b}; Clore et al., 1990). La fortaleza de la interpretación Lipari-Szabo es que da una impresión sobre la laxitud de partes de la molécula, en ausencia de cualquier modelo específico sobre la naturaleza exacta de la movilidad interna. De esta manera, la función de densidad espectral se adapta a fin de incluir parámetros que describan las desviaciones respecto del tiempo de correlación esperado. Para una molécula que describa movimientos aleatorios isotrópicos, la función de densidad espectral se puede describir como:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_m}{1 + (\omega \tau_m)^2} + \frac{(S_f^2 - S^2) \tau}{1 + (\omega \tau_m)^2} \right] \quad (2.9)$$

donde $\tau = \tau_e \tau_m / (\tau_e + \tau_m)$, τ_m es el tiempo de correlación rotacional isotrópico de la molécula, τ_e es el tiempo de correlación efectivo de los movimientos internos (Mandel et al., 1995), $S^2 = S_f^2 S_s^2$ es el cuadrado del parámetro de orden generalizado que caracteriza la amplitud del movimiento. S^2 puede variar entre 0 (movimiento interno no



Modelo	Movimientos	Parámetros
1	Movilidad interna muy rápida	S^2
2	Movilidad interna no despreciable	S^2, τ_e
3	Idem 1, pero con intercambio químico	S^2, R_{ex}
4	Idem 2, pero con intercambio químico	S^2, τ_e, R_{ex}
5	Extendido incluyendo movilidad rápida y lenta	S^2, τ_e, S^2_f

Figura 2.5. Modelos de difusión rotacional isotrópica de acuerdo al formalismo *Model Free*. En el esquema de la derecha se representan algunos de los parámetros que describen los movimientos internos de cada núcleo (imagen adaptada del manual del programa *Model Free*; Palmer). (En una molécula con difusión rotacional isotrópica $D_{||} = D_{\perp}$).

restringido, libre rotación) y 1 (movimiento interno totalmente restringido). S^2_f y S^2_s son los cuadrados de los parámetros de orden de los movimientos internos en las escalas de tiempo rápidas y lentas, respectivamente.

A partir de las medidas de los parámetros de relajación, T_1 , T_2 y NOE heteronuclear, para las amidas peptídicas y, habiendo seleccionado un modelo de difusión que describa la rotación de la proteína, se pueden modelar los movimientos internos que tienen lugar a lo largo del esqueleto polipeptídico. Los programas desarrollados por Palmer y colaboradores (Cole & Loria, 2003; Palmer et al., 1991) utilizan métodos estadísticos que clasifican el comportamiento dinámico de cada par N-H, en los cinco modelos descritos por Lipari y Szabo. En la Figura 2.5 se resumen las características de cada modelo y se esquematizan algunos parámetros. El modelo 1 se obtiene suponiendo que $S^2_s = 1$ y $\tau_f \rightarrow 0$ y es aplicable si los movimientos en la escala de tiempo lento son insignificantes y en la escala de tiempo rápida son muy rápidos (< 20 ps). El modelo 2 se obtiene suponiendo que $S^2_s = 1$ y se ajusta si los movimientos en la escala de tiempo lento son insignificantes. Los modelos 3 y 4 se derivan de los modelos 1 y 2 respectivamente, incorporando en el modelo de relajación un término de intercambio químico, R_{ex} . Para los modelos de 1 a 4, $S^2 = S^2_f$. El Modelo 5 asume sólo que $\tau_f \rightarrow 0$ y

utiliza una expresión para la función de densidad espectral más compleja que la Ecuación 2.9. Este modelo sirve para explicar el movimiento de pares N-H cuya función de autocorrelación no se puede aproximar a una exponencial simple de acuerdo con el modelo de Lipari y Szabo, sino que requiere al menos dos de estas funciones exponenciales (Clore et al., 1990).

2.6 Bibliografía

Abraham A. (1994) The principles of nuclear magnetism: Oxford University Press.

Bax A, Grishaev A. (2005) Weak alignment NMR: a hawk-eyed view of biomolecular structure. *Curr Opin Struct Biol* 15(5):563-70.

Bothe JR, Nikolova EN, Eichhorn CD, Chugh J, Hansen AL, Al-Hashimi HM. (2011) Characterizing RNA dynamics at atomic resolution using solution-state NMR spectroscopy. *Nat Methods* 8(11):919-31.

Cole R, Loria JP. (2003) FAST-Modelfree: a program for rapid automated analysis of solution NMR spin-relaxation data. *J Biomol NMR* 26(3):203-13.

Clore GM, Szabo A, Bax A, Kay LE, Driscoll PC, Gronenborn AM. (1990) Deviations from the simple two parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J Am Chem Soc* 112: 4989-4991.

Hore PJ, Jones JA, Wimperis S. (2000) NMR: the toolkit. Oxford, New York : Oxford University Press, - Oxford chemistry primers ; 92. 85 p.

Hornak JP. (1996-2008) The Basics of NMR. <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/index.html>

Gronenborn AM. (2002) The importance of being ordered: improving NMR structures using residual dipolar couplings. *C R Biol* 325(9):957-66.

Güntert P. (1998) Structure calculation of biological macromolecules from NMR data. *Q Rev Biophys* 31(2):145-237.

Jimenez Garrido B. (2003) Aplicación de la Resonancia Magnética Nuclear de Sistemas Paramagnéticos a la Determinación de Propiedades Estructurales y Dinámicas de las Proteínas Rusticianina y Calbindina D9K. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions.

Kay LE. (2005) NMR studies of protein structure and dynamics. *J Magn Reson* 173(2):193-207.

Keeler J. (2005) Understanding NMR spectroscopy. 1st ed., John Wiley and Sons. New York. 476 p.

Kirkpatrick S, Gelatt CD Jr, Vecchi MP. (1983) Optimization by simulated annealing. *Science* 220(4598):671-80.

Lipari G, Szabo A. (1982a) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J Am Chem Soc* 104: 4546-4559.

Lipari G, Szabo A. (1982b) Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J Am Chem Soc* 104: 4559-4570.

Lipsitz RS, Tjandra N. (2004) Residual dipolar couplings in NMR structure analysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:387-413.

Mandel AM, Akke M, Palmer AG 3rd. (1995) Backbone dynamics of *Escherichia coli* ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *J Mol Biol* 246(1):144-63.

Millet O. (2009a) El movimiento de las proteínas. Investigación y ciencia, ISSN 0210-136X, N° 391, 2009, págs. 68-75.

Millet O. (2009b) Conceptos de relajación en RMN. Curso Avanzado de RMN, Jaca 2009. Unidad de Biología Estructural COCbioGUNE. <http://www.germn.org/>

Neuhaus D, Williamson MP. (2000) The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis. 2nd ed., WILEY-VCH, New York. 656 p.

Palmer AG 3rd, Rance M, Wright PE. (1991) Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural abundance carbon-13 heteronuclear NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 113: 4371-4380.

Pons M. (2005) Conceptos de relajación en RMN. Curso Avanzado de RMN, Jaca 2005. Unidad de Biología Estructural COCbioGUNE. <http://www.germn.org/>

Vance S. (2012) The relationship between structure and function in natural surfactant proteins. PhD

Thesis. School of Chemistry. College of Science and Engineering. University of Glasgow.

Wüthrich K. (1990) Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. J Biol Chem 265(36):22059-62.

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

3. Obtención de As-p18

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

3. Obtención de As-p18

3.1 Introducción

En el campo de la biología estructural es fundamental que la proteína de estudio se encuentre altamente concentrada, homogénea y en gran estado de pureza (Kim et al., 2008). Particularmente, para los estudios por espectroscopía de RMN, se requieren concentraciones elevadas, de 0.5 mM o superiores y la adquisición de espectros multidimensionales implica la introducción de marca isotópica en ^{13}C y ^{15}N .

A fin de responder a estos requisitos, la ingeniería genética proporciona mediante la tecnología de ADN recombinante, la manera de sobreexpresar la proteína de interés. A partir de cultivos crecidos en medios mínimos, suplementados con $^{15}\text{N}\text{-NH}_4\text{Cl}$ y ^{13}C -glucosa, como fuentes únicas de nitrógeno y carbono, se logra el enriquecimiento isotópico. Pero dado su elevado costo, resulta crítico optimizar los protocolos de obtención y purificación a fin de obtener rendimientos aceptables.

El gran estado de pureza de la muestra (> 95 %) implica una purificación exhaustiva, y que generalmente incluye distintas técnicas cromatográficas. Por último, debe evaluarse el estado monomérico de la proteína en la muestra final para garantizar su homogeneidad conformacional. Y con este mismo fin, también es necesario para el caso particular de una proteína que une lípidos, liberarla completamente de los ligandos copurificantes y eventualmente proveer una muestra uniformemente cargada con algún ligando de interés.

En este capítulo se describe el proceso de obtención de As-p18 para lo cual se diseñó un protocolo que persiguiera óptimos rendimientos de purificación, y que permitiera obtener una muestra de pureza y estabilidad compatibles con los estudios a realizar. De esta manera se informan las tareas realizadas a nivel de biología molecular, expresión, purificación y caracterización de la proteína de estudio.

3.2 Materiales y Métodos

Técnicas de Biología Molecular

Minipreparación de Plásmidos

La obtención de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli* según el protocolo de Sambrook (Sambrook & Russell, 2001). Se emplearon 5 mL de cultivo

bacteriano fresco, crecido *overnight* a 37 °C en un tubo Falcon. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 100 µL de una solución Tris-ClH 25 mM, EDTA 10 mM, pH= 8, agitando en vórtex. Se adicionaron 200 µL de una solución NaOH 0.2 M, SDS 1 %, recientemente preparada. Se agitó suavemente por inversión, hasta resuspensión completa del pellet, y se incubó a temperatura ambiente por no más de 5 min. Se adicionaron 150 µL de una solución acetato de potasio 5 M, ácido acético 11.5 % v/v, enfriada en hielo para detener la lisis. Se agitó suavemente por inversión y se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 1200 g por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionaron 450 µL de fenol-cloroformo (1:1), estabilizado con solución de Tris-HCl 100 mM pH 8, y se incubó a temperatura ambiente por 5 min eliminando así proteínas y restos de lípidos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se adicionó 1 mL de etanol 96 % y se incubó a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó a 12000 rpm durante 25 min. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70 %. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se removió el sobrenadante y se invirtió cuidadosamente el tubo sobre un papel absorbente para secar a temperatura ambiente. Se disolvió el pellet en 20-50 µL de agua bidestilada estéril y se midió en una dilución apropiada la absorbancia a 280 y 260 nm para evaluar su grado de pureza. Se agregó RNAsa en una concentración aproximada de 20 µg/mL y se guardó a -20 °C.

Alternativamente se emplearon *kits* comerciales *QuickLyse Miniprep Kit*, *Qiagen* siguiendo las especificaciones del fabricante.

Electroforesis en Geles de Agarosa

Bajo la acción de un campo eléctrico los fragmentos de DNA se separan en base a su velocidad de migración, la cual es inversamente proporcional al tamaño de los fragmentos. Este análisis se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa para comprobar la integridad de las construcciones en los plásmidos. Para la visualización de vectores linealizados y sus correspondientes insertos se emplearon geles de agarosa 1 %. La solución se preparó en buffer Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH=8. Para evidenciar la presencia de ácidos nucleicos en un transiluminador UV, se agregó 1 µL de Bromuro de Etidio de una concentración 10 mg/mL. Debido a su alto carácter mutagénico el bromuro de etidio se reemplazó por *SYBR® Safe*, *Invitrogen* siguiendo especificaciones del fabricante.

Precipitación con Etanol

Para concentrar y/o purificar una muestra de DNA se realizó una precipitación con etanol (Sambrook & Russell, 2001). Se agregó dos veces el volumen de etanol 96 % y el equivalente al 10 % del volumen de la muestra de una solución acetato de sodio 3 M. Se incubó 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min y se removió el etanol. Se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70 %. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se removió el etanol, se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en agua bidestilada estéril y se guardó a -20 °C.

Digestión con Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción presentan gran especificidad y generan terminales ligables, lo que permite el corte y análisis del DNA. Las enzimas de restricción Bam HI, Hind III, Nco I, Nde I, Pst I, Xba, fueron obtenidas de *Promega* (USA). Todas las digestiones fueron realizadas según el siguiente protocolo: 1 a 5 µL de DNA (0.5-1.0 µg), 1 µL 10X Buffer provisto junto con las enzimas, 0.1 µL BSA, 0.5 µL de cada enzima a utilizar y H₂O bidestilada estéril necesaria para completar un volumen final de 10 µL. Se incubó 2 h a 37 °C.

Obtención de Bacterias Competentes

Para la generación de bacterias capaces de ser transformadas, se siguió el protocolo detallado por Sambrook (Sambrook & Russell, 2001). Se inocularon 3 mL de medio de cultivo líquido LB (triptona 1 %, levadura 0.5 %, NaCl 1%) sin antibiótico con un stock de bacterias no competentes recién descongeladas. Se incubó toda la noche a 37 °C, con agitación fuerte. Se diluyeron los 3 mL de cultivo en 100 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación fuerte hasta DO_{600nm}=0.5. Se dejó enfriar depositando el cultivo sobre hielo durante aproximadamente 10-15 min. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 30 mL de buffer TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15 %, pH=5,8; esterilizado por filtro de 0.22 µm). Se incubó sobre hielo durante 90 min y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 4 mL de buffer TFB2 (10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, Glicerol 15 %, pH= 8.0; esterilizado en autoclave). Las bacterias fueron almacenadas a -70 °C en alícuotas de 500 µL.

Transformación de Bacterias Competentes

Mediante esta técnica se logra la incorporación de DNA plasmídico en el citoplasma bacteriano. En este trabajo de Tesis se transformaron células pertenecientes a distintas cepas de *E. coli*. Las cepas JM109 y XL1Blue, utilizadas para obtener masa de plásmido y almacenamiento; y las cepas BL21 (DE3) y M15, utilizadas para obtener masa de proteína. Se tomaron 1.5 μL de una *miniprep* (~ 60 ng plásmido/ μL) y se depositaron en un Eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 100 μL del stock de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 30 min. Se aplicó un shock térmico incubando en un baño termostatzado a 42 °C durante 50 s, seguidos de 2 min de incubación en hielo. Se agregaron 900 μL de medio LB sin antibiótico y se incubó con agitación fuerte durante 2 h a 37 °C. Se realizaron al menos dos diluciones del cultivo y se distribuyeron con ayuda de una espátula de Drigalsky sobre placas de medio LB con ágar 1.5 %, conteniendo el antibiótico correspondiente, que depende del vector que se usó para la transformación. Se incubó toda la noche en estufa a 37 °C. Se seleccionaron varias colonias y se constató la presencia del plásmido mediante una minipreparación y posterior análisis en gel de agarosa. Las bacterias transformadas fueron almacenadas a -70 °C con una concentración final de glicerol del 20 %.

Plásmidos

Se recibieron desde el laboratorio del Dr. Kennedy (Universidad de Glasgow, UK), los siguientes plásmidos:

- pQE-30 (*Qiagen*) con el inserto de la proteína As-p18 con cola de histidina en el extremo N-terminal. Posee un *cassette* de resistencia a ampicilina que permite la selección de bacterias que hayan incorporado el plásmido.
- pREP4 que porta el gen *lacI*, el cual permite, mediante un sistema de represión *in trans*, una fuerte regulación de la expresión proteica. Posee un *cassette* de resistencia a kanamicina.

Cultivo Bacteriano y Expresión de Proteína

Luego de evaluar el efecto de la concentración de inductor, la temperatura y el tiempo de incubación, y considerando las distintas velocidades de crecimiento según el medio empleado, se fijaron las condiciones de cultivo detalladas a continuación. Se buscó además que los tiempos de incubación respondieran a un sentido práctico en la ejecución del protocolo.

Medios

Luria-Bertani (LB)

NaCl	10 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O destilada csp	1 L

M9 5X

Na ₂ HPO ₄	34 g
KH ₂ PO ₄	25 g
NaCl	2.5 g
H ₂ O bidestilada csp	1 L

Medio mínimo M9

M9 (5X)	50 mL
MgSO ₄ (1 M)	0.5 mL
CaCl ₂ (50 mM)	0.5 mL
Glucosa* (20 % p/v)	2.5 mL
NH ₄ Cl* (2 M)	2.5 mL
Tiamina (50 mg/mL)	0.25 mL
H ₂ O bidestilada csp	250 mL

*Los reactivos con marca isotópica D-Glucosa (U-¹³C₆, 99 %) y cloruro de amonio (¹⁵N, 99 %) fueron adquiridos de *Cambridge Isotope Laboratories* (USA).

Expresión de As-p18 para Estudios de RMN

A partir de un stock de BL-21 [pREP4] [pQE-30] se inoculó en 10 mL de medio líquido LB, distribuidos en 2 tubos Falcón (de 50 mL de capacidad) con kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL, dejándose crecer este cultivo *overnight* a 37 °C con una agitación de 230 rpm. El cultivo resultante se utilizó como inóculo de un medio fresco: 1 L de M9 1X, distribuidos en 5 erlenmeyers de 1 L de capacidad. De acuerdo a la marca requerida en la proteína, se reemplazaron las soluciones de NH₄Cl y glucosa por el equivalente en droga sólida (cloruro de amonio (¹⁵N, 99 %) y D-Glucosa (U-¹³C₆, 99 %)). Adicionalmente, a fin de mantener la presión de selección, se suplementó el medio con kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL. Este cultivo se creció a 37 °C con una agitación de 230 rpm hasta que alcanzó un valor de densidad óptica a 600 nm entre 0.8 y 1.0 UA. En ese momento, se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado de IPTG (en concentración final 1 mM) y se incubó en las mismas condiciones por 17 h más. Posteriormente, el cultivo fue fraccionado convenientemente y centrifugado durante 45 min a 4000 rpm y 4 °C. Las células se resuspendieron en buffer de unión (ver más adelante) (típicamente entre 20 y 30 mL de volumen final) y almacenadas a -70 °C hasta su posterior uso.

Expresión de As-p18 No Marcada para Demás Estudios

A partir de un stock de BL-21 [pREP4] [pQE-30] se inoculó en 5 mL de medio líquido LB, con kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL, dejándose crecer este cultivo *overnight* a 37 °C con una agitación de 230 rpm. El cultivo resultante se utilizó como inóculo de un medio fresco de 500 mL de LB (distribuidos en 5 erlenmeyers de 1 L)

suplementado con kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL. Este cultivo se creció a 37 °C con una agitación de 230 rpm hasta que alcanzó un valor de densidad óptica a 600 nm entre 0.8 y 1.0 UA. En ese momento, se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado de IPTG (en concentración final 1 mM) y se incubó en las mismas condiciones por 3 h más. Posteriormente, el cultivo fue fraccionado convenientemente y centrifugado durante 15 min a 4000 rpm y 4 °C. Las células se resuspendieron en buffer de unión (ver más adelante), típicamente entre 20 y 30 mL de volumen final y fueron almacenadas a -70 °C hasta su posterior uso.

Purificación, Cuantificación y Caracterización de Proteína

Soluciones Amortiguadoras

Buffer de unión: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 1 mM NaN₃, pH= 7.4.

Buffer de lavado: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 1 mM NaN₃, pH= 7.4.

Buffer de elución: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM NaN₃, pH= 7.4.

Buffer PBS: 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 1 mM NaN₃, pH=7.4

Buffer NMR: 20 mM NaCl, 20 mM NaPi, pH=7.4

Todas las soluciones fueron debidamente degaseadas antes de su uso.

Lisis por Sonicación

Las bacterias fueron descongeladas y se agregaron *Benzonase-nuclease* (1:3000 v/v) (*Novagen*) y un *cocktail* de inhibidores de proteasa (*Roche*) en una concentración de 1 tableta/~30 mL de extracto bacteriano a fin de evitar proteólisis indeseada. Alternativamente, se emplearon DNAsa (1:3000 v/v) y *cocktail* de inhibidores de proteasa (*Calbiochem*) en una relación 1:1500 v/v. La sonicación se realizó en un equipo *Sanyo Soniprep 150* a una amplitud de 10 micrones; o alternativamente con sonicador de punta *Branson*, en tres series de 5 min, con un ciclo de trabajo del 50 %; o hasta observar pérdida de viscosidad y cambio de coloración. Durante el proceso se empleó un baño de hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Las fracciones soluble e insoluble se separaron por centrifugación a 20000 g por 30 min a 4 °C.

Cromatografía de Afinidad en Columna de Níquel

La fracción soluble obtenida de la centrifugación posterior al sonicado fue filtrada con jeringa empleando filtros de 0.4 µm para remover restos celulares. Seguidamente se pasó por gravedad a una columna de afinidad con resina Ni-NTA (*Novagen* o

alternativamente *GE Healthcare*), de 5 mL. Luego se agregó a la columna de forma secuencial: 20 mL de buffer de unión, 15 mL de buffer de lavado y finalmente se eluyó la proteína con 10 mL de buffer de elución. Esta última fracción se diluyó a la mitad con agua bidestilada, a fin de disminuir la concentración de imidazol en contacto con la membrana de los concentradores. Luego se concentró el volumen resultante empleando tubos concentradores Vivaspín (*Sartorius*) mediante centrifugación a 4000 rpm y 4 °C, hasta llegar a un volumen final de ~1.5 mL.

Cromatografía de Exclusión Molecular

Con la finalidad de eliminar contaminantes tales como moléculas pequeñas presentes en los buffers (v.g. imidazol), o proteínas de diferentes pesos moleculares que co-eluyeran con As-p18 en la columna de afinidad, se realizó una cromatografía de filtración en geles. Se empleó una columna *Superdex 75 GL 10/300* (*GE Healthcare*) en un equipo de FPLC *Äkta design* (*GE*). Se equilibró la columna con 30 mL de buffer PBS, luego se inyectó la muestra de proteína (típicamente entre 400 y 500 µL por inyección) y se corrió a un flujo de 0.5 mL/min, hasta alcanzar 1.5 volúmenes de columna. La cromatografía se monitoreó por absorbancia UV a 280 nm.

Cromatografía en Fase Reversa (RP-HPLC)

Para remover moléculas hidrofóbicas unidas a la proteína se realizó HPLC en fase reversa empleando un equipo Merck-Hitachi, con detector UV a 280 nm con una columna *Vydac C₈* (250x4.6 mm) equilibrada con 90 % de solvente A [0.1 % (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) en agua] y 10 % de solvente B [acetonitrilo, TFA 0.1 % (v/v)]. Alternativamente se empleó una columna *Phenomenex, Luna C₈* (OOG-4249-EO, 5µ, 250x4.6 mm) en un equipo *Dionex IC System* (GP50/ AS50). La corrida se realizó a un flujo de 1 mL/min empleando los siguientes gradientes lineales: 10-30 % solvente B en 5 min; 30-70 % de B en 13 min; 70-100 % de B en 2 min; 100 % de B por 5 min.

Medida de ¹⁴C

A fin de corroborar la eficacia del método de deslipidización, se determinó la radioactividad del medio de marcación antes y después del proceso, por conteo de centelleo líquido en un equipo *Wallac* (modelo 1214 *Rackbeta*). Previo al paso de HPLC, se agregaron unas ~590000 cpm de [1-¹⁴C] Palmitato y se incubó unos minutos a 4 °C para permitir que el ácido graso se uniera a la proteína As-p18. Se midieron las DPM / 20 µL muestra.

Liofilización

Luego de la etapa de RP-HPLC, la fracción correspondiente a la proteína se transfirió a un balón con pico esmerilado o a un tubo Falcon y se congeló sobre las paredes con N₂ líquido, o en el dispositivo de enfriado con etanol presente en el liofilizador o en freezer a -70 °C, según disponibilidad. Se liofilizó hasta sublimación completa de los solventes y se resuspendió en agua. Se ajustó el pH agregando bicarbonato de amonio y se volvió a liofilizar. Este segundo paso de liofilización se realizó para asegurar la total remoción de TFA. Finalmente se reconstituyó la muestra en buffer acuoso.

Cuantificación

Se calculó la concentración proteica aplicando la Ley de Lambert-Beer, para la absorbancia medida a 280 nm:

$$Abs = l \times c \times \epsilon \quad (3.1)$$

Donde l es el recorrido de la luz, c es la concentración de la muestra y ϵ es el coeficiente de extinción molar de la proteína (expresado en M⁻¹cm⁻¹).

El coeficiente de absortividad molar se estimó usando *Biology WorkBench 3.2* que considera la combinación lineal de los coeficientes de extinción de los únicos residuos que contribuyen significativamente al espectro de absorción en el rango 276 – 282 nm, tirosinas, triptofanos y cisteínas, ponderados por su contenido en la proteína, en forma teórica, en una solución de guanidina-HCl 6M (Edelhoch, 1967). Se utilizó la fórmula:

$$\epsilon_{M, Gdn.HCl} = a\epsilon_{Tyr} + b\epsilon_{Trp} + c\epsilon_{Cys} \quad (3.2)$$

donde ϵ_{Tyr} , ϵ_{Trp} , y ϵ_{Cys} son los coeficientes de extinción molar de residuos tirosina, triptofano y cisteína a la longitud de onda deseada (Gill & von Hippel, 1989) y a , b , y c corresponden al número de residuos por molécula de proteína.

Electroforesis de Proteínas en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida se realizó, únicamente con fines analíticos, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, según el método glicina-SDS-PAGE de Laemmli (Laemmli, 1970). Se usó un sistema discontinuo consistente en un gel de apilamiento (poliacrilamida 4 % en Tris-HCl 0.126 M, pH 8.8, SDS 0.26 % p/v) seguido por un gel de separación (poliacrilamida 15 % en Tris-HCl 0.36 M, pH 8.8, SDS 0.26 % p/v), con un espesor de 1 mm. Para el armado, primero se formó el gel de

separación, añadiendo sobre éste 500 µL de isopropanol para alinear la interfase en contacto con el aire. Luego de la polimerización se retiró el alcohol, se lavó la superficie con agua y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación, se colocó la mezcla del gel de apilamiento y de inmediato, los peines. Alternativamente, se emplearon geles prefabricados *NuPAGE* 4-12 % Bis Tris (*Invitrogen*) con el gel de corrida correspondiente (1x MES *running buffer*). Las muestras se incubaron en solución de siembra (glicerol 5 %, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 0.1 %, azul de bromofenol 0.1 mg/mL) durante 5 min a 100 °C y posteriormente se sembraron en cantidades tales que la banda de interés contuviese al menos 1 µg de proteína (límite de detección de la tinción con azul de bromofenol). Para la corrida se utilizó una solución de Tris 0.3 % p/v, glicina 1.44 % p/v y SDS 0.1 % p/v. Se aplicó un voltaje de 100 V por 30 min y luego uno de 200 V por 1 h aproximadamente, hasta que el frente de corrida llega a pocos milímetros del borde inferior del gel. Como marcador de peso molecular se usó *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS* (*Amersham/GE Healthcare*). En todos los casos se empleó el sistema *Miniprotean III* (*Bio-Rad*). Luego de la corrida, los geles se tiñeron con una solución de Azul Brillante de Coomassie R250 0.1 % p/v en metanol: ácido acético: agua (5:5:2). La decoloración de los geles se consiguió mediante ~2 h de incubación a temperatura ambiente en solución decolorante 10 % ácido acético, 30 % metanol.

Espectros de 1D ¹H de As-p18

Los espectros de 1D ¹H de As-p18 se adquirieron a partir de una muestra de proteína no marcada, (2 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 0.01 % NaN₃, pH 7.4, 298 K). Los experimentos se llevaron a cabo con supresión de la señal de agua mediante la secuencia de doble eco de spin, con gradientes de pulso (DPFGSE) (Hwang & Shaka, 1995).

3.3 Resultados

Biología Molecular

Al recibir los plásmidos pQE-30[As-p18] y pREP4, se transfirieron a cepas de almacenamiento *E. coli* JM109, adquirida de *Novagen* (USA) y XL1Blue, cedidas por la Dra. Casalengué (UNMdP). Se corroboró la presencia de los insertos correspondientes (~532 pb), mediante digestión de *minipreps* con las enzimas de restricción adecuadas y electroforesis en geles de agarosa (Figura 3.1). La secuencia codificante para As-p18

fue verificada posteriormente por secuenciado bidireccional, con *primers* que hibridan con las secuencias del T5Promoter y el T5Terminator del vector (*Macrogen*, Korea).

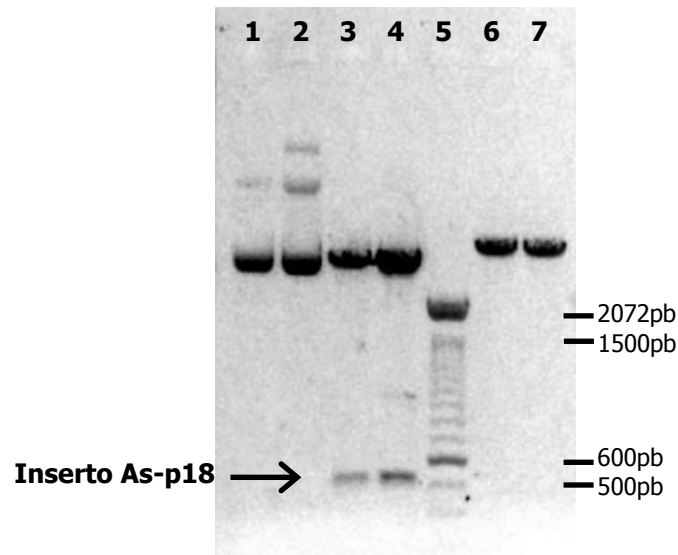


Figura 3.1. Gel de agarosa con digestiones y minipreps de plásmido pQE-30. 1: pQE-30 sin digerir, *miniprep* de JM109. 2: pQE-30 sin digerir, *miniprep* de XL1-Blue. 3: pQE-30 digerido con BamHI y PstI, *miniprep* de JM109. 4: pQE-30 digerido con BamHI y PstI, *miniprep* de XL1-Blue. 5: Marcador PM 100bp *DNA ladder*. Se destaca la banda de 600pb. 6: pQE-30 digerido sólo con BamHI, *miniprep* de JM109. 7: pQE-30 digerido sólo con PstI, *miniprep* de JM109.

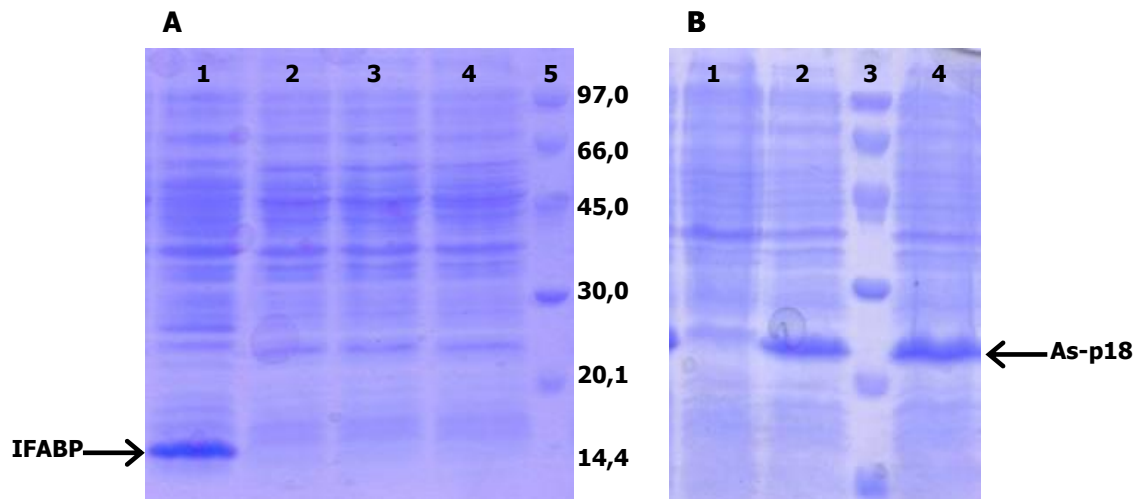


Figura 3.2. SDS-PAGE de screening de expresión, en células M15 (gel A) y BL21 (gel B). **Gel A** *Calle 1*: Control positivo de expresión (colonia que expresa a la FABP de intestino, de ~15 kDa). *Calles 2, 3, 4*: bacterias M15 transformadas con pQE-30 [As-p18] que no muestran una gran expresión de As-p18 al ser inducidas con 0.8 mM de IPTG. *Calle 5*: Marcador de PM. **Gel B** *Calle 1*: BL21 transformadas con pQE-30 y pREP4, sin inducción. *Calle 2*: Ídem anterior, inducidas con 0.5 mM de IPTG. *Calle 3*: Marcador de PM. *Calle 4*: Ídem 2, inducidas con 1.0 mM de IPTG.

En primer término se transformaron células *E. coli* M15 –que portan el plásmido pREP4– (cedidas por el Dr. Robello, Uruguay, por intermedio de la Dra. Echeverría, Fac. de Cs. Veterinarias, UNLP) con el plásmido pQE-30[As-p18]. Debido a que no se logró una expresión eficiente (Figura 3.2.A), tal como se anticipaba de la experiencia de trabajos previos en el laboratorio del Dr. Kennedy, se decidió cambiar el sistema de expresión por el disponible en nuestro laboratorio: BL21 (DE3) (*Novagen*). En este sistema se logró una sobreexpresión de la proteína de interés (Figura 3.2.B).

Los vectores pQE de *Qiagen* utilizan el promotor del fago T5 el cual se encuentra bajo el control de dos secuencias del operador *lac* que evitan la expresión previa a la inducción. El promotor T5 es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* y la inducción se lleva a cabo por adición de IPTG que libera al represor Lac de la secuencia doble del operador. Como los vectores pQE no llevan el gen *lacI*, la cepa huésped debe proporcionar un exceso de represor Lac. Para ello, se transformaron bacterias competentes BL21 de forma secuencial y/o simultánea con los dos plásmidos, pQE-30 y pREP4 (Figura 3.3). Se seleccionaron aquellos clones que al poseer las resistencias conferidas por dichos plásmidos, crecieron en un medio con kanamicina y ampicilina. Una vez establecidas las condiciones óptimas de cultivo para cada medio (LB y M9) se procedió a purificar la proteína de interés.

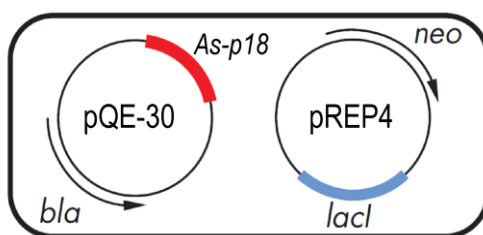


Figura 3.3. Representación del sistema de expresión: bacterias BL21 transformadas con los plásmidos pQE-30 y pREP4. El primero además del gen para la proteína de interés, [As-p18], posee un gen *bla* que codifica para una β -lactamasa. El plásmido pREP4 contiene los genes *lacI* y *neo*, que codifican para el represor Lac y para una fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, respectivamente.

Purificación

La purificación de As-p18 requirió la aplicación de un conjunto de técnicas bioquímicas, empleadas regularmente en el campo de la investigación, con el propósito enriquecer progresivamente las muestras en la proteína de interés, y finalmente obtener una muestra de As-p18 pura, homogénea y deslipidizada. A partir de lisados bacterianos

obtenidos por sonicación y sometidos a centrifugación para eliminar restos celulares insolubles, se aplicaron distintas cromatografías: de afinidad en columna de Ni^{2+} , de exclusión molecular y finalmente, con el propósito de deslipidizar la proteína, se empleó la cromatografía de interacción hidrofóbica mediante HPLC fase reversa (Figura 3.4).

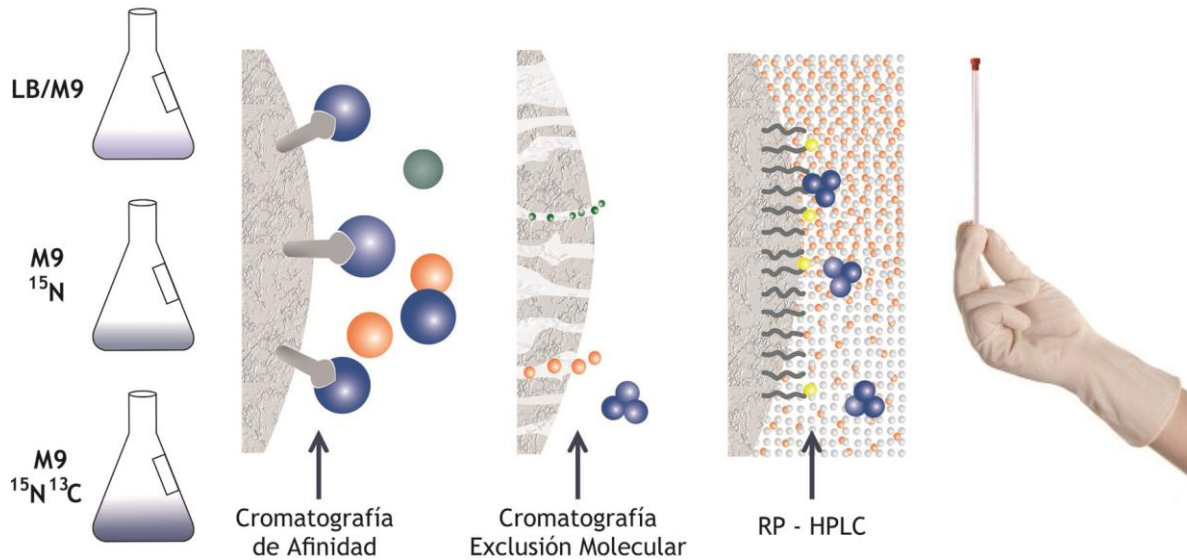


Figura 3.4. Secuencia de la estrategia de purificación de As-p18. El primer paso de cromatografía de afinidad descartó los contaminantes más importantes. El pasaje por una columna de exclusión molecular como etapa de pulido permitió lograr un alto nivel de pureza. Finalmente, para la remoción de los ligandos lipídicos copurificantes se recurrió a la cromatografía de HPLC fase reversa.

Cromatografía de Afinidad

De las diversas técnicas de purificación disponibles, la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, es una de las más difundidas por su simplicidad y selectividad (Hochuli et al., 1988). En el caso particular de la cromatografía de afinidad a níquel, se aprovecha la interacción reversible de alta afinidad de los residuos de histidina por el ion Ni^{2+} , a través de los donantes de electrones presentes en los grupos imidazol. La proteína recombinante As-p18 está fusionada a una serie de seis histidinas consecutivas, codificadas dentro del plásmido de expresión, de manera tal que se introduce una cola de polihistidina (*His-tag*) en el extremo N-terminal. Mediante el empleo de columnas derivatizadas con ácido nitrilotriacético (NTA), que actúa como quelante de los iones de níquel divalente, se retuvo la proteína marcada con la cola de histidina, al tiempo que se la separó de las proteínas sin etiquetar. Luego se eluyeron las proteínas contaminantes que tuvieran una afinidad natural para los iones Ni^{2+} mediante

lavados con soluciones con baja concentración de imidazol (5-25 mM). A continuación, la proteína de interés se libera cuando se hace pasar una solución de alta concentración de imidazol (250 mM), que compete y desplaza a las histidinas enlazadas. Las uniones inespecíficas a través de interacciones electrostáticas fueron inhibidas por la presencia de NaCl en todas las soluciones empleadas.

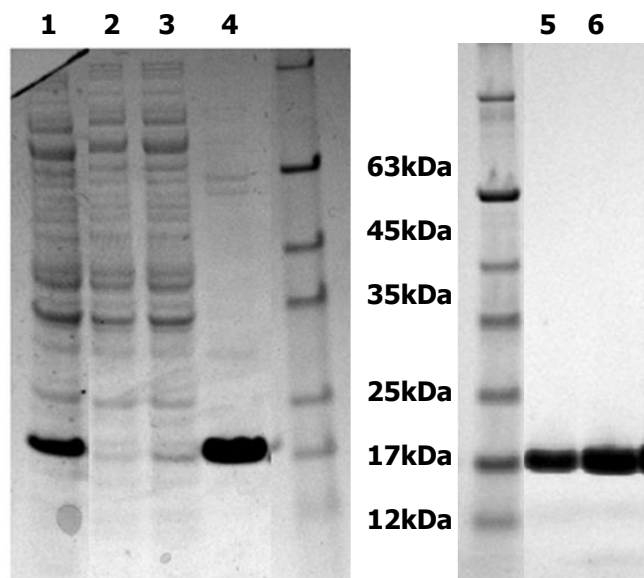


Figura 3.5. SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de afinidad y exclusión molecular. *Calle 1:* fracción soluble luego de la lisis celular. *Calle 2:* fracción proteica que no se une a la columna de afinidad. *Calle 3:* fracción de proteína eluida con solución de lavado 25 mM imidazol. *Calle 4:* fracción eluida con 250 mM de imidazol. *Calles 5 y 6:* fracciones colectadas de la columna de exclusión molecular.

Mediante un SDS-PAGE de las distintas fracciones de la purificación de afinidad, se pudo comprobar la alta selectividad de esta técnica (Figura 3.5). Durante las etapas de carga y lavado de la columna se eliminó la mayor parte de las proteínas contaminantes. La fracción correspondiente a la elución de As-p18 mostró un gran enriquecimiento en esta proteína. Sin embargo, se distinguieron algunas bandas provenientes de proteínas que presentaron pegado inespecífico. La mayoría de estas impurezas presentaron un peso molecular significativamente mayor al de As-p18, por lo cual se continuó el protocolo con una cromatografía de exclusión molecular como paso de pulido.

Cromatografía de Exclusión Molecular.

La muestra obtenida en el apartado anterior se cargó en una columna de exclusión molecular *Superdex 75 10/300 GL*, compuesta por dextranos entrecruzados y agarosa, que contiene una gama de tamaños de poro. La progresión de las moléculas presentes en

la muestra a través de la columna, está condicionada por su capacidad para penetrar las distintas clases de poros: las moléculas grandes, que no atraviesan los poros pequeños, eluyen primero; moléculas pequeñas se verán retrasadas por la fase estacionaria y eluyen al final.

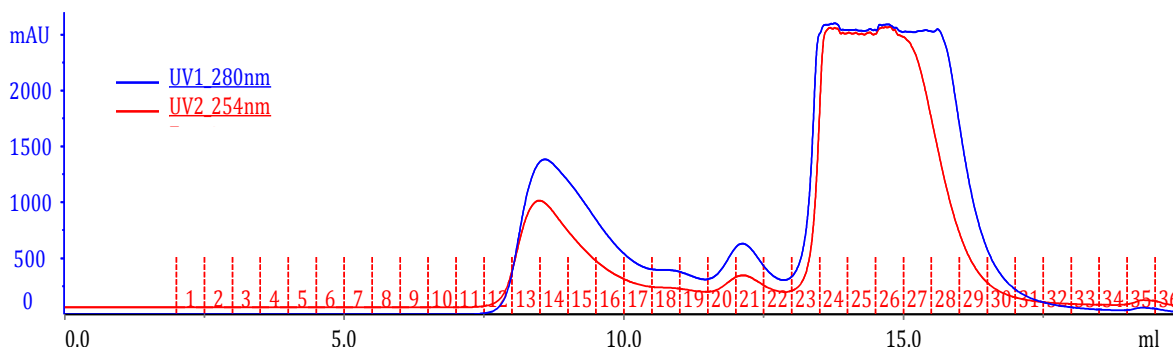


Figura 3.6. Perfil de elución de As-p18 a través de columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL. El pico predominante alrededor de los 14 mL de volumen de elución corresponde a As-p18. La muestra inyectada fue lo suficientemente concentrada (nótese la señal de As-p18 a 280 nm que se encuentra saturada) permitiendo evidenciar la señal de otras proteínas contaminantes, presentes en mucha menor proporción.

El perfil de elución monitoreado por absorbancia a 280 nm y verificado por SDS-PAGE (Calles 5 y 6 de la Figura 3.5) mostró un pico predominante alrededor de los 14 mL de volumen de elución, correspondiente a As-p18 (Figura 3.6). Cuando la muestra inyectada fue lo suficientemente concentrada, se alcanzó a evidenciar otros picos de muchísima menor intensidad y menor volumen de elución, pertenecientes a proteínas copurificantes de mayor tamaño. El paso por una columna de exclusión molecular resultó eficaz como paso de pulido en el protocolo de purificación. Permitió la separación de trazas contaminantes y alcanzar un elevado grado de pureza. También resultó útil para eliminar contaminantes tales como el imidazol, componente de las soluciones amortiguadoras.

Cromatografía en Fase Reversa (RP-HPLC)

Dado que As-p18 es una proteína con capacidad de unión a compuestos de naturaleza lipídica, resulta ineludible remover los ligandos endógenos provenientes del entorno bacteriano a fin de obtener una muestra homogénea. Con este propósito se recurrió a la cromatografía de HPLC en fase reversa, que si bien implica un tratamiento de la muestra bastante drástico, garantizaba la exhaustiva eliminación de lípidos que no podía

asegurarse con los sistemas clásicamente empleados en nuestro laboratorio para otras FABPs (columna de interacción hidrofóbica *Lipidex*).

Los métodos cromatográficos en fase reversa permiten separar moléculas en base a su polaridad. Los sistemas de alto desempeño (HPLC) utilizan alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación. En el sistema empleado la fase estacionaria estaba conformada por partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados (C_8). De esta manera, las moléculas de proteína, previamente desnaturalizadas por el tratamiento con ácido trifluoroacético, se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Lo mismo les sucede a los componentes hidrofóbicos que hasta aquí copurificaron con As-p18. Aunque las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas, de modo tal que para eluir las moléculas de proteína se va aplicando un gradiente de hidrofobicidad creciente, a medida que se incrementa la concentración de acetonitrilo.

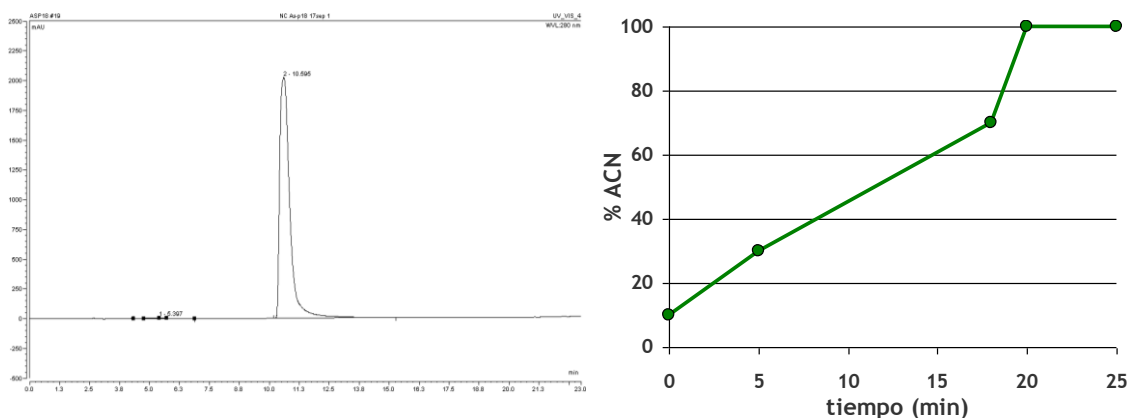


Figura 3.7. Cromatograma de As-p18 a través de columna RP-HPLC C_8 . Se siguió la elución de la proteína por su absorbancia a 280 nm. A la derecha, gradiente de ACN empleado.

Los cromatogramas y geles de SDS-PAGE corroboraron la presencia de un único pico correspondiente a As-p18 cuando en la columna se alcanza a una relación de acetonitrilo:agua ~50:50 (Figura 3.7). En rigor, se encontró que la posición del pico era variable de acuerdo a la columna C_8 utilizada y/o diferencias en el acetonitrilo empleado. En el INIBIOLP, empleando una columna *Vydac* se registró elución al ~54 % ACN. En el Laboratorio del Dr. Smith, en la Universidad de Glasgow, empleando una columna *Phenomenex* se registró elución al ~48 % ACN. Si bien tanto las dimensiones y características de la matriz de las columnas, como la calidad de los ACN

eran similares, puede atribuirse la pequeña diferencia a que las columnas podrían encontrarse con distinto grado de impregnación a sustancias altamente hidrofóbicas provenientes de usos anteriores, modificando el perfil de elución. También el uso de distintas marcas comerciales de reactivos podría generar una pequeña variación.

Para verificar la eficacia del sistema, previo a una corrida cromatográfica se incubó a As-p18 con $[1-^{14}\text{C}]$ palmitato. Seguidamente se determinó la radioactividad del medio de marcación antes y después del pasaje por la columna de HPLC, por conteo de centelleo líquido. El análisis de las DPM, permitió corroborar que la fracción de As-p18 se encuentra libre de marca. Se comprobó además que las DPM provenientes del ^{14}C -palmitato se concentraron en las fracciones que eluyeron a 100 % de acetonitrilo.

RP-HPLC para el Reciclaje de Muestras de As-p18 con Doble Marca Isotópica

Un aspecto interesante de esta técnica es que permitió la separación de proteína parcialmente degradada en muestras envejecidas. Esta ventaja se aprovechó para reciclar muestras de proteína con doble marca isotópica (^{15}N y ^{13}C) (Figura 3.8).

La degradación de las muestras se pone de manifiesto en los experimentos de RMN, en los que las señales comienzan a ensancharse, perderse o desplazarse. Como el costo de la muestra con ^{15}N y ^{13}C es elevado, se vuelve pertinente el esfuerzo de su recuperación. Frente a esa situación se intentó recuperar la fracción no degradada en muestras envejecidas. En primer término se probó el pasaje de la muestra por la columna de exclusión molecular anteriormente empleada. El cromatograma mostró dos picos superpuestos, sin poder resolverse de manera práctica uno de otro. Se intentó entonces la separación por cromatografía de afinidad, pero ambas formas de la proteína eluyeron en la misma fracción, poniendo de relieve que la proteína degradada conserva la afinidad por el Ni^{2+} , y por ende es de esperar que posea el *tag* de histidina; aunque el análisis de estas fracciones por SDS-PAGE evidenciaron 3 bandas: una correspondiente al peso de As-p18 y otras dos compatibles con un clivaje que producía dos fracciones de distinto tamaño. El hecho de que ni la cromatografía de exclusión molecular, ni la de afinidad permitieran separar la proteína conservada de la degradada, hicieron pensar que la proteína degradada no se separa en sus fragmentos constituyentes, salvo bajo el tratamiento desnaturalizante que reciben las muestras antes del SDS-PAGE. Para ampliar el conocimiento sobre el clivaje producido, se realizó un *Western-Blot* con anticuerpos anti *His-tag*. De esta manera se concluyó que el fragmento de menor tamaño en la proteína degradada, corresponde al N-terminal de la proteína.

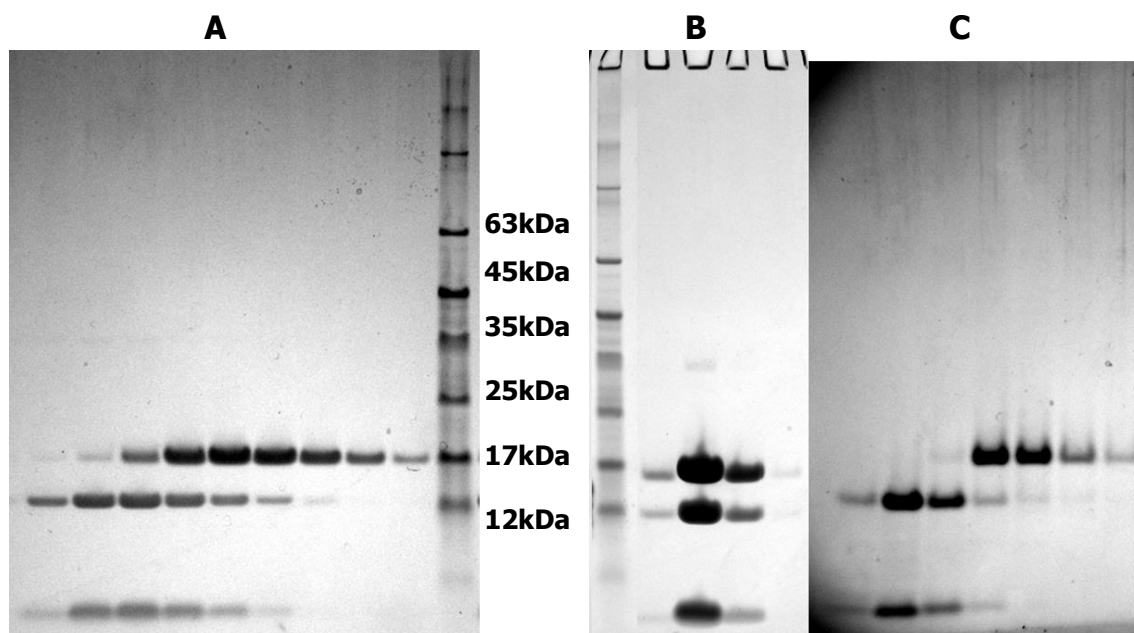


Figura 3.8. Análisis de SDS-PAGE de distintos métodos para recuperar ^{15}N ^{13}C As-p18 en muestras parcialmente degradadas. El gel A, muestra las distintas fracciones de elución empleando la columna de exclusión molecular previamente descrita. El gel B, muestra las fracciones que eluyen de la columna de afinidad. El gel C, muestra el contenido de las fracciones separadas por la columna de RP-HPLC. Este último método fue el más apropiado para conseguir la separación de la proteína intacta. La banda de menor tamaño corresponde a un fragmento del N-terminal de As-p18, el de peso intermedio, al C-terminal; y el fragmento de mayor tamaño, a la proteína conservada.

Controles Estructurales por *Light Scattering*

A fin de garantizar la homogeneidad conformacional la muestra se empleó un sistema de exclusión molecular acoplado a un detector de dispersión de luz (*light scattering*) (empleando facilidades del IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, por cortesía del Dr. J. Santos). El pico eluido a partir de una columna *Superdex-200 HR10/30* se monitoreó con un detector de *light scattering*, permitiendo corroborar una población monodispersa con peso molecular alrededor de los 20 kDa (Figura 3.9).

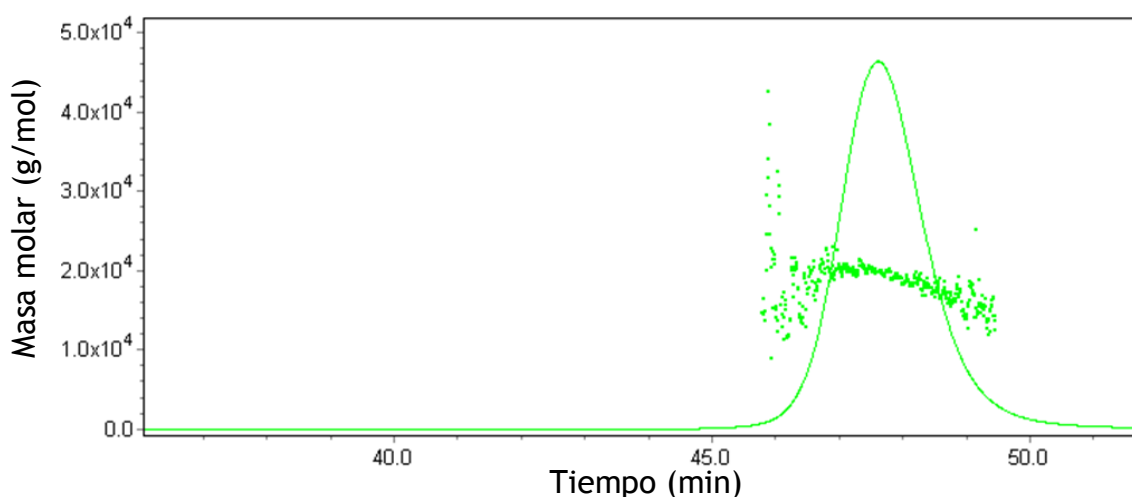


Figura 3.9. Cromatograma de As-p18 a través de columna de exclusión molecular acoplada a un detector de *light scattering*. La línea continua representa la absorbancia a 280 nm, y los puntos representan la distribución de pesos moleculares de acuerdo a la dispersión de luz detectada.

Controles Estructurales por ^1H RMN

Otra manera de evidenciar características conformacionales de forma rápida, es mediante la toma de un espectro 1D ^1H RMN. Como se ve en la Figura 3.10, el espectro 1D de As-p18 mostró señales agudas y las mismas se hallaron bien dispersas en las regiones de H metílicos (-0.5 - 1.5 ppm) y amídicos (7 - 10 ppm). Esto fue indicativo de que la proteína se hallaba plegada y en estado monomérico. Lo primero se infirió a partir de que en una proteína plegada los distintos núcleos de hidrógeno están expuestos a distintos ambientes, producto de una conformación tridimensional determinada, y de esta manera estos distintos entornos se traducen en señales a distintos valores de frecuencia. Si por el contrario la proteína se encontrara desplegada, todos los núcleos de H, percibirían más o menos el mismo entorno, generando señales más superpuestas en el espectro. En cuanto a las posibles formas multiméricas de proteína, su aparición determinaría eventos vinculados a fenómenos de relajación, que finalmente se manifestarían en un ensanchamiento considerable de los picos. En el espectro 1D de As-p18, donde se ratificó el estado monomérico, se apreciaron señales agudas y finas.

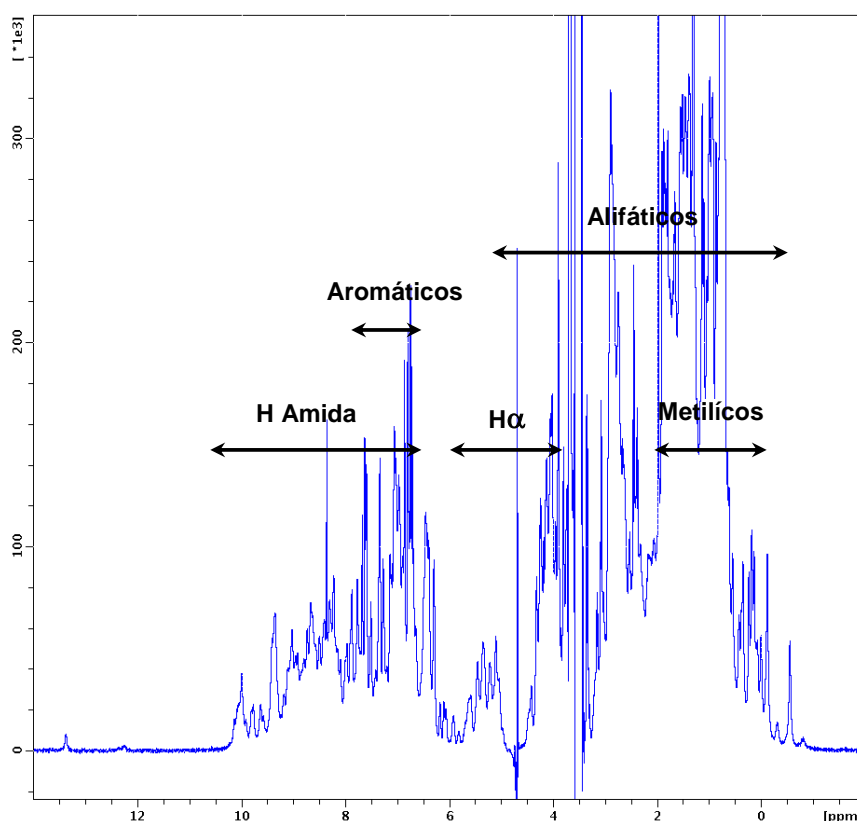


Figura 3.10. Espectro 1D ^1H de As-p18. Escala en ppm. Se muestra la distribución de desplazamientos químicos de los diferentes grupos de protones.

3.4 Conclusiones y Perspectivas

Si bien la cepa de expresión indicada para la familia de vectores de pQE, es la M15 (portadora del plásmido [pREP4]); no se obtuvieron resultados aceptables con este sistema. En su lugar, se evaluó la sobreexpresión de As-p18 en células BL21 transformadas con ambos plásmidos, [pREP4] y [pQE-30]. En este sistema alternativo se lograron niveles de expresión satisfactorios. Una posterior comparación de los fenotipos de las cepas empleadas proporcionó una posible explicación para este resultado. La cepa BL21 (DE3), a diferencia de la M15, posee mutaciones en los genes *lon* y *ompT* que codifican para dos proteasas. De esta manera, es probable que como resultado de una disminución en la proteólisis, se obtuviera una mayor cantidad de proteína expresada cuando se emplearon las células BL21.

Los protocolos de purificación desarrollados permitieron obtener As-p18 en forma soluble, libre de lípidos y en concentraciones compatibles con los estudios de RMN. El rendimiento de proteína a partir de medio mínimo M9 (25 mg/L) fue apreciablemente mayor respecto al publicado previamente por otros autores (16 mg/L, Mei et al., 1997).

En una modificación ulterior en el protocolo de cultivo en medio LB, a partir de la experiencia de uno de los miembros del laboratorio, se encontró que se obtenían mejores rendimientos al aumentar la aireación. Con ese fin, el medio de cultivo se distribuyó procurando disminuir la relación con el volumen del recipiente (v.g. 500 mL de medio distribuidos en 5 erlenmeyers de 1 L de capacidad; en lugar de 1 L de medio). Asimismo, se aumentó la velocidad de agitación. De esta manera, se alcanzó un rendimiento de 40 mg/L LB para aquellas muestras de As-p18 destinadas a estudios de extracción lipídica (protocolo que no incluye paso de deslipidización). Tal como se menciona en la literatura técnica, la abundante provisión de oxígeno es determinante para el rendimiento de un cultivo; y si bien no siempre se reconoce su importancia, debiera ser uno de los puntos infaltables a optimizar durante el diseño de protocolos de obtención de proteínas recombinantes (Berthold et al.).

Respecto a la cromatografía de HPLC fase reversa, este método resultó eficaz para la remoción de los lípidos copurificantes. Se corroboró que el tratamiento de desnaturalización y de replegado no afecta a la estructura, ni al comportamiento de la proteína, tal como lo revelaron los espectros de RMN y estudios biofísicos de unión a ligandos. Cabe destacar que esta cromatografía fue muy útil para recuperar proteína con marca isotópica de las muestras utilizadas para RMN que mostraran signos parciales de degradación.

Todas las mejoras en el rendimiento y recuperación de proteína fueron de gran importancia para optimizar el uso de los reactivos con marca isotópica.

Como perspectiva para futuros estudios se podría completar el trabajo de biología molecular iniciado, a fin de obtener una forma de proteína recombinante que contenga la etiqueta de poli-histidina escindible. Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, el grupo colaborador en la Universidad de Glasgow logró mediante amplificación por PCR, subclonar la secuencia de la proteína dentro del vector pET28. Para ello se diseñaron *primers* que permitieran insertar la secuencia de interés entre los sitios de corte NdeI y XhoI del MCS del nuevo vector. Actualmente, se cuentan con células DH5 α transformadas, por lo que restaría el pasaje del plásmido a la cepa de expresión BL21. El vector pET28 incluye una secuencia de poli-histidina seguida por un sitio de corte para trombina. De esta manera, podría obtenerse As-p18 libre de etiqueta posterior

al tratamiento enzimático. Esta muestra presentaría una ventaja práctica para ciertos procedimientos como la obtención de RDCs o producción de cristales con mejor difracción, o para la clara interpretación de experimentos de interacción proteína-membrana. Dejando de lado estos aspectos prácticos, generalmente se considera que el *His-tag*, al ser corto y carecer de estructura, no condiciona el plegamiento ni la función de la proteína a la que se haya fusionado (Carson et al., 2007). Adicionalmente, existen trabajos publicados con LBPs de parásitos donde luego de comprobar que las propiedades de unión no se ven alteradas por la presencia del *tag* de histidina de los vectores pQE; optan por el uso de la proteína con *tag* en virtud de reducir la manipulación de la muestra (McDermott et al., 2002).

3.5 Bibliografía

Berthold DA, Jeisy VJ, Sasser TL, Shea JJ, Frericks HL, Shah G, Rienstra CM. (sin fecha) Top ten tips for producing ^{13}C ^{15}N protein in abundance. *Camb Isot Lab Appl Note* 15:1–4.

Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, Delucas LJ. (2007) His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63(Pt 3):295-301.

Edelhoc H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6(7):1948-54.

Gill SC, von Hippel PH. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182(2):319-26.

Hochuli E, Bannwarth W, Dobeli H, Gentz R, Stuber D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nat Biotech* 6:1321-1325.

Hwang TL, Shaka AJ. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed-field gradients. *J Magn Reson, Series A* 112: 275-279.

Kim Y, Bigelow L, Borovilos M, Dementieva I, Duggan E, Eschenfeldt W, Hatzos C, Joachimiak G,

Li H, Maltseva N, Mulligan R, Quartey P, Sather A, Stols L, Volkart L, Wu R, Zhou M, Joachimiak A. (2008) Chapter 3. High-throughput protein purification for x-ray crystallography and NMR. *Adv Protein Chem Struct Biol* 75:85-105.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.

Mei B, Kennedy MW, Beauchamp J, Komuniecki PR, Komuniecki R. (1997) Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 272(15):9933-41.

McDermott L, Kennedy MW, McManus DP, Bradley JE, Cooper A, Storch J. (2002) How helminth lipid-binding proteins offload their ligands to membranes: differential mechanisms of fatty acid transfer by the ABA-1 polyprotein allergen and Ov-FAR-1 proteins of nematodes and Sj-FABPc of schistosomes. *Biochemistry* 41(21):6706-13.

Sambrook J, Russell DW. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA. 3rd Edition.

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

4. Estructura de As-p18 por RMN

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

4. Estructura de As-p18 por RMN

4.1 Introducción

Como se comentó en el Capítulo 1, As-p18 pertenece a una nueva subfamilia dentro de las FABPs. A pesar de los indicios a nivel secuencial y por modelado que predicen características estructurales exclusivas para este nuevo *subcluster* denominado nemFABP, no se conoce la estructura de ningún miembro de esta subfamilia. Siendo As-p18 la primera nemFABP descrita en la literatura, y considerando la estrecha relación estructura-función, se estableció una fuerte motivación para dilucidar su plegamiento tridimensional.

En este Capítulo se presentan los estudios realizados para la determinación de la estructura en disolución, altamente refinada de As-p18 en su forma holo. El complejo determinado comprende al ligando ácido oleico, cuya elección se relaciona con la información reportada en el Capítulo 1 y con la particular afinidad que exhibe As-p18 para este ácido graso (ver Capítulo 7). De esta manera, se detalla la preparación de la muestra, el procesamiento de datos subsiguiente a la adquisición de los espectros, la asignación de los desplazamientos químicos de las resonancias, la obtención de restricciones experimentales, el protocolo de cálculo y las etapas de validación. Debido a la complejidad del sistema proteína-ligando, en algunas secciones se describen procedimientos específicos que permitieron abordar y superar dificultades metodológicas.

4.2 Preparación de Muestras

Las muestras de As-p18, marcadas en ^{15}N , ^{13}C o en abundancia natural se obtuvieron a partir de su expresión en medio mínimo M9 y purificadas como se describe en el Capítulo 3. La proteína purificada se intercambió en solución buffer de NMR de composición 20 mM NaCl, 20 mM NaPi, pH=7.4. Seguidamente, mediante el uso de concentradores Vivaspín (*Sartorius*) de 20 mL con membrana de corte en 5 kDa, se concentró hasta un volumen de 570 μL . Este volumen se transfirió a un tubo *ependorf* completado con 30 μL de D_2O (para el *lock* del campo magnético). Luego se adicionó oleato de sodio, en sus variantes marcadas y abundancia natural, disueltas en etanol deuterado, en una relación ~4:1 (lípidos:proteína) para asegurar saturación. Se incubó durante unos minutos y se centrifugó a 13000 g a 4 °C por 10 min para eliminar

cualquier partícula no soluble. Finalmente, el volumen de ~600 μL fue transferido a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

4.3 Adquisición de Espectros

Todos los experimentos se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance, operando a una frecuencia de ^1H de 600.13 MHz, equipado con una criosonda de triple resonancia TCI 5 mm, a 298K. En la mayoría de los experimentos se emplearon secuencias de pulsos estándar presentes en la biblioteca del espectrómetro. Para algunos de ellos se realizaron modificaciones específicas que se mencionan en cada caso.

La adquisición, procesamiento y posterior análisis de los espectros se realizaron en procesadores con entorno Linux CentOS.

4.4 Procesamiento de Datos de RMN

Procesamiento de Espectros por Transformada de Fourier Directa

Los espectros muestreados de manera convencional se procesaron mediante el paquete de programas *Azara* (Dr. Wayne Boucher, www.ccpn.ac.uk/Azara). Los *scripts* de procesamiento se crearon a partir de archivos de datos *Bruker*, por medio del programa *ReferenceB* (Dra. Krystyna Bromek de la Universidad de Glasgow).

Las señales se apodizaron con funciones adecuadas (gaussiana, campana seno, etc) y los puntos de la FID se extendieron mediante la adición de ceros (*zerofilling*) para optimizar la resolución de la señal y minimizar los artefactos de truncamiento. Seguidamente se aplicó la transformada de Fourier para pasar del dominio del tiempo al dominio de la frecuencia. A continuación, con el espectro transformado se llevó a cabo la corrección de fase. Cuando fuera necesario, se aplicó una corrección de línea base o una diferencia de convolución para eliminar la señal del agua residual.

Muestreo Reducido No-Uniforme (Aleatorio)

Los experimentos de RMN multidimensional heteronuclear son fundamentales para cualquier proyecto que involucre proteínas de tamaño moderado. Con este enfoque, se logran eliminar los solapamientos y las ambigüedades en la asignación de las señales de manera satisfactoria. Sin embargo, el muestreo de dimensiones adicionales trae aparejado un aumento considerable en el tiempo para registrar los experimentos. Con el propósito de mitigar esta dificultad, numerosos esfuerzos se han realizado a lo largo de

los años, y actualmente se cuenta con dos estrategias principales que permiten acortar los tiempos de adquisición. La primera estrategia apunta a minimizar el tiempo entre *scans* sucesivos por medio de experimentos de pulsado rápido (Brutscher & Schanda, 2009). La segunda, se basa en un muestreo reducido de las dimensiones indirectas, existiendo diversos esquemas para acotar la selección de puntos a registrar (Hyberts et al., 2012). En el caso particular de los experimentos 3D heteronucleares (HNCO, HN(CA)CO, HNCACB y CBCA(CO)NH), empleados para la asignación secuencial de As-p18, se utilizó un muestreo reducido no uniforme (NUS). A diferencia de lo que sucede en un experimento con muestreo lineal convencional, en el NUS se adquieren un número reducido de puntos de la FID en las diferentes dimensiones, de forma aleatoria (Hoch et al., 2012). Como consecuencia del registro parcial de puntos, los experimentos con este tipo de muestreo no pueden procesarse mediante transformada de Fourier directa. En su lugar, se requieren otros métodos de proceso, como el de reconstrucción de máxima entropía (*MaxEnt*). Tal como se menciona en la literatura (Rovnyak et al., 2004), conjugando esquemas de muestreo apropiados con el procesamiento con *MaxEnt* es posible obtener espectros con una resolución equivalente a los registrados con un muestreo exhaustivo convencional, pero en muchísimo menos tiempo. Esto fue aplicado y comprobado para los experimentos de asignación del *backbone* de As-p18. Particularmente, para el experimento HNCO se realizó una comparación entre las dos formas de muestreo. Los espectros se registraron con 8 *scans* por incremento y los puntos hipercomplejos por plano NC, fueron 684 (muestreo convencional) y 476 parcialmente aleatorizados (muestreo no uniforme). La versión NUS tomó 30 % menos de tiempo (5h 05m vs 7h 20m), mientras los espectros obtenidos procesados por *MaxEnt* mostraron el doble de resolución digital para ambas dimensiones indirectas (Figura 4.1). A su vez, se pudo constatar una reducción notoria en el tamaño de los artefactos cuando se comparó con la versión muestreada de manera convencional.

Métodos Alternativos a la Transformada de Fourier Directa

Tal como se mencionó anteriormente, los espectros muestreados de manera reducida no pueden ser procesados con transformada de Fourier directa. En su lugar existen varios métodos de procesamiento alternativos, como la reconstrucción de máxima entropía (Hoch & Stern 2001; Rovnyak et al., 2003), el método de filtrado de diagonalización (Chen et al., 2004; Hu et al., 2000), la descomposición multidimensional (Luan et al., 2005; Orekhov et al., 2003) o la integración de Fourier numérica (Kazimierczuk et al.,

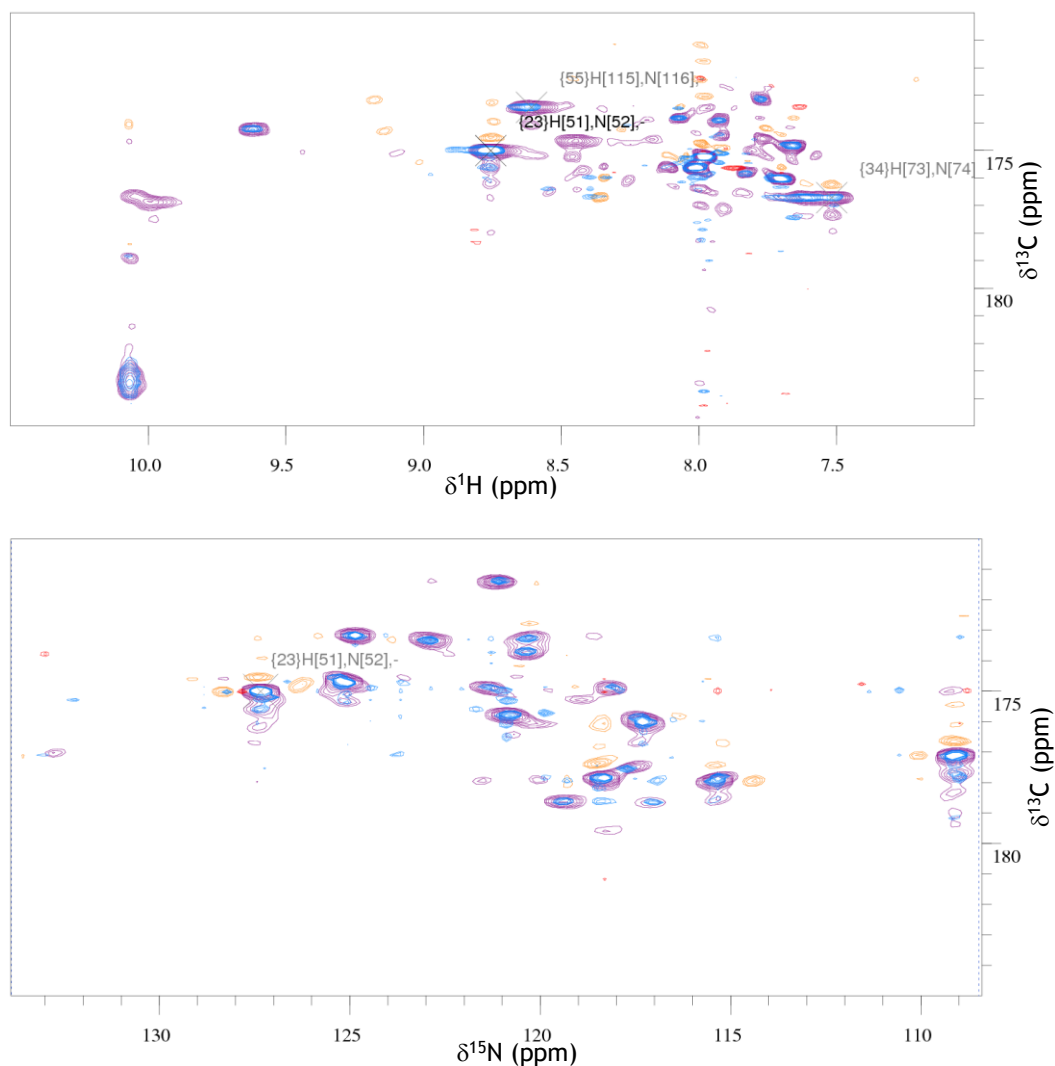


Figura 4.1. Comparación de espectros HNCOSY muestreados de forma convencional (violeta) o de manera no uniforme (azul). Se muestran los planos HC (arriba) y NC (abajo) donde se evidencia una mejor resolución para la versión de muestreo aleatorio procesado por *MaxEnt*. Además, como se muestra para el sistema de spin {23}, el tamaño relativo de los artefactos es mucho menor en el espectro NUS (los contornos negativos aparecen en naranja y rojo para el muestreo convencional y aleatorio, respectivamente).

2006; Marion, 2005), que permiten reconstruir el espectro multidimensional.

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, se empleó la reconstrucción de máxima entropía para el procesamiento de los espectros truncados. El procesamiento por *MaxEnt* construye espectros de prueba que compara con el resultado experimental. De los espectros posibles simulados, consistentes con los datos experimentales, se selecciona aquel que implica el mínimo de suposiciones, es decir el que tiene máxima entropía (Sibisi et al., 1984).

4.5 Asignación Específica de Resonancias

El primer paso en la determinación estructural por RMN, consiste en la identificación de las señales individuales en los distintos espectros y su asociación a un determinado núcleo de la proteína. Para el proceso de asignación espectral se corrieron experimentos que, mediante el acoplamiento escalar, relacionan núcleos conectados por enlaces. Las asignaciones se realizaron utilizando el paquete de programas *CCPNMR Analysis*, en sus versiones 2.1 y 2.2 (Vranken et al., 2005).

Asignación Secuencial del Esqueleto Aminoacídico

En primer lugar se asignaron las resonancias de los grupos amida a partir de un espectro ^{15}N -HSQC de As-p18. La secuencia de pulsos utilizada en el experimento ^{15}N -HSQC permite obtener un pico de correlación cruzada por cada ^1H unido a un núcleo ^{15}N . En las proteínas esto sucede: en los grupos amidas de las glutaminas y asparaginas; en los grupos amina de argininas, histidinas y triptofanos y; en los grupos amida de los enlaces peptídicos de cada residuo en el esqueleto aminoacídico, a excepción de las prolinas.

Para el caso de los picos provenientes de cadenas laterales su identidad fue asignada en base a sus valores de corrimiento químico característicos, confirmados subsecuentemente en espectros NNOESY. Adicionalmente, la aparición de pares de picos con idéntica posición en la dimensión del nitrógeno y con niveles de contorno dispuestos de manera particular, ayudó a identificar grupos amida de cadena lateral. Los picos remanentes fueron asignados a sistemas de espín con sus resonancias amida asociadas de ^1H y ^{15}N (Figura 4.2).

Una estrategia para conocer la identidad de los núcleos del esqueleto aminoacídico utiliza experimentos de triple resonancia que se corren de a pares, como por ejemplo, HNCACB/CBCA(CO)NH. Estos experimentos permiten correlacionar las frecuencias de resonancia de los HN con las de los $\text{C}\alpha$ y $\text{C}\beta$ de cada residuo, y a su vez, con las del residuo anterior. En el experimento HNCACB (Wittekind & Mueller, 1993) la magnetización se transfiere entre la resonancia amida de un residuo y las resonancias de los $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ del mismo residuo y del residuo anterior. El experimento complementario, en este caso el CBCA(CO)NH (Grzesiek & Bax, 1993), permite discriminar entre las correlaciones intra-residuo e inter-residuo (residuo i e $(i-1)$, respectivamente), ya que la magnetización en este experimento se dirige a través del grupo carbonilo del residuo anterior, involucrando solamente a las resonancias de los $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ $(i-1)$. Durante la

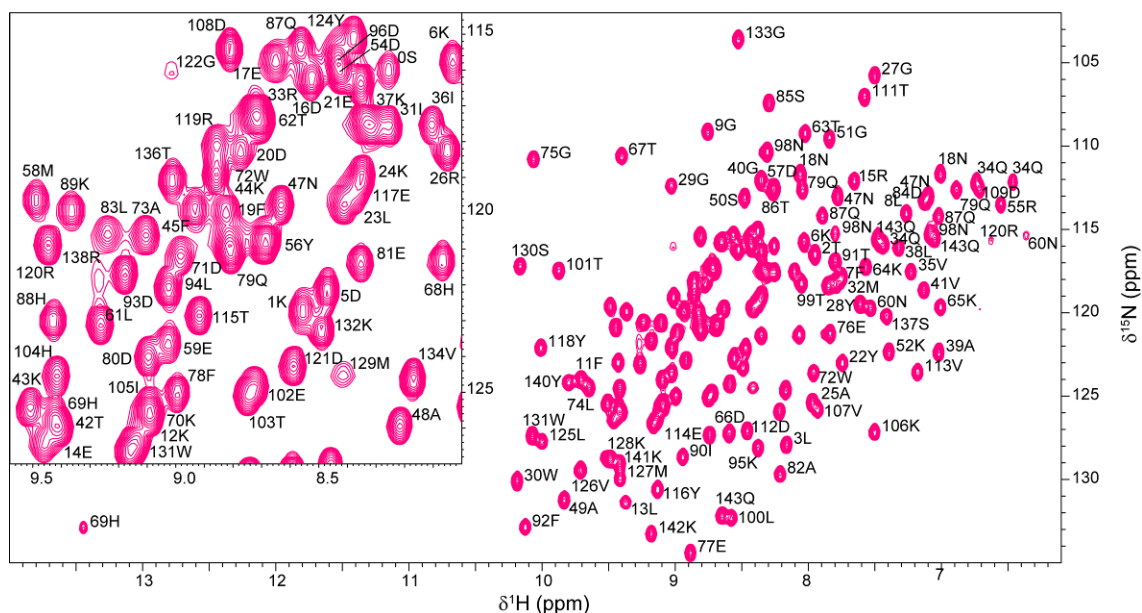


Figura 4.2. Espectro bidimensional ^1H - ^{15}N HSQC de As-p18 recombinante. Los *cross peaks* asignados se muestran con una letra y un número, correspondiente al código de aminoácidos y a la numeración en la secuencia proteica, respectivamente. El *inset* muestra una expansión de la región del espectro comprendida entre ^1H ; 8.00 – 9.58 y ^{15}N ; 114.40 – 127.00 ppm.

asignación de la cadena principal, empleando la estrategia anteriormente mencionada pueden aparecer ambigüedades debido a que dos residuos coincidan en las frecuencias de los núcleos investigados. Así, el residuo predecesor de un cierto aminoácido no puede determinarse porque hay más de una posibilidad. Este problema comienza a aparecer en proteínas de tamaño moderado como As-p18 y empeora al trabajar con proteínas que al ser más grandes, presentan mayor probabilidad de presentar señales solapadas. Para resolver ambigüedades se utilizan otros pares de experimentos, como el HNCO y el HN(CA)CO, que aportan información a través de la frecuencia del CO del aminoácido predecesor (Clubb et al., 1992). La aparente redundancia en la información de los dos juegos de experimentos permite aumentar la confiabilidad de la asignación. Conociendo de antemano la secuencia proteica, y sobre la base de algunas frecuencias particularmente distintivas, es posible concatenar y asignar la identidad de cada pico en los espectros (Figura 4.3).

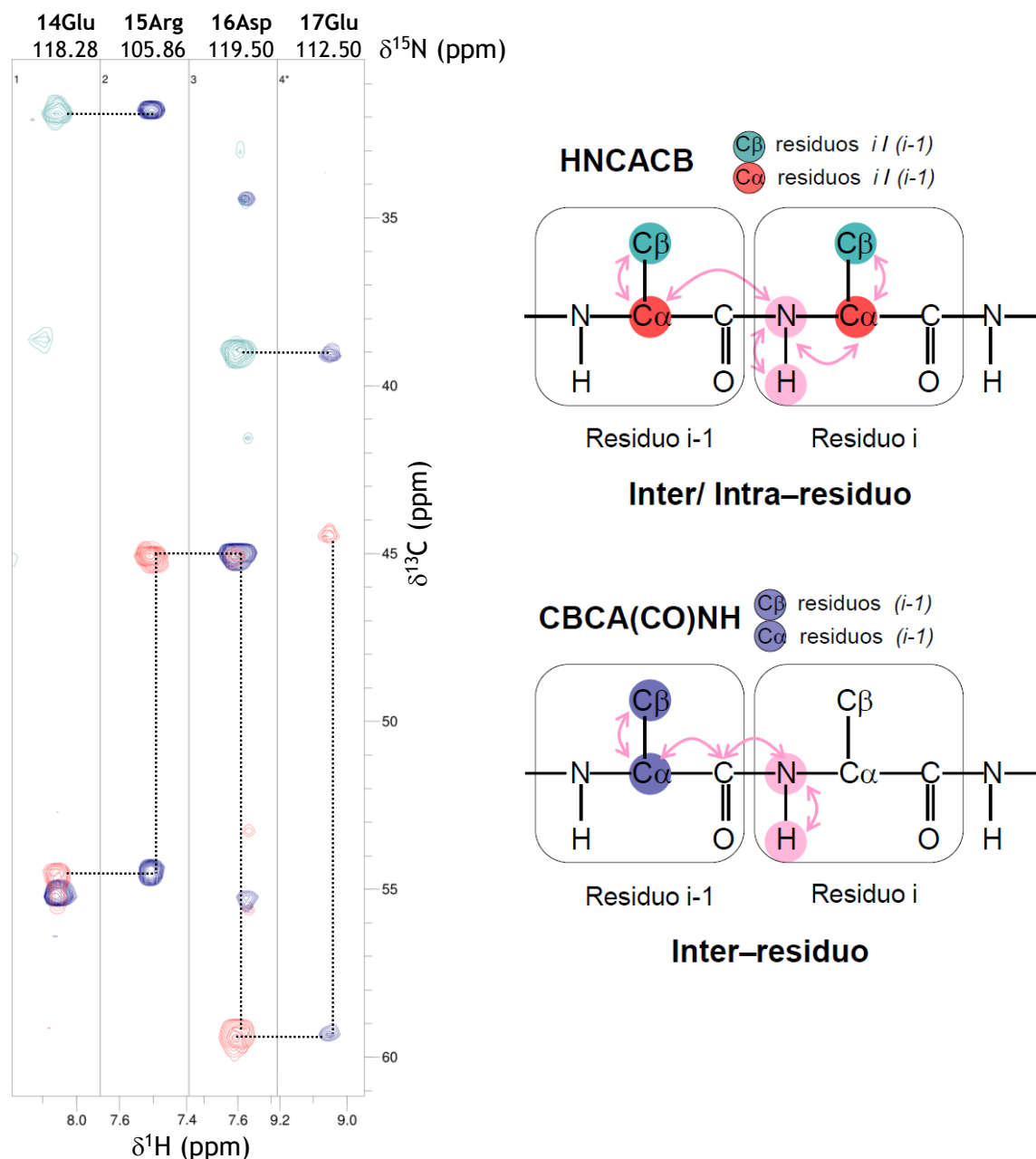


Figura 4.3. Espectros HNCACB y CBCA(CO)NH empleados para la asignación secuencial. Cada tira de espectro corresponde a un sistema de espín perteneciente a resonancias amida consecutivas. El desplazamiento químico del ^{15}N aparece en la parte superior de cada tira, junto con la identidad del sistema de espín. El experimento HNCACB muestra los $C\alpha$ (*cross peaks* en rojo) y los $C\beta$ (*cross peaks* en verde azulado) intra (i) e inter ($i-1$) residuo. En superposición se muestra del experimento CBCA(CO)NH que identifica los $C\alpha$ y $C\beta$ del residuo anterior únicamente (*cross peaks* intraresiduo, ($i-1$), en azul). Las coincidencias en los desplazamientos químicos de las señales $C\alpha_i$ y $C\alpha_{i-1}$ y $C\beta_i$ y $C\beta_{i-1}$ se representan en la figura con una línea punteada.

En este trabajo de Tesis se emplearon para la asignación secuencial, los pares de experimentos heteronucleares de triple resonancia, HNCACB/CBCA(CO)NH y

HNCO/HN(CA)CO, adaptados para muestreo no-uniforme por el Dr. Brian Smith (University of Glasgow). De esta manera, y con el uso del programa de asignación *CCPNMR Analysis* fue posible identificar el 97 % de los pares HN/N, 97.9 % de los C α y 99.3 % de los C β , teniendo en cuenta la secuencia de la proteína nativa (es decir, excluyendo el *His-tag* que al ser móvil y flexible no suele generar señales en los espectros).

Asignación de Cadenas Laterales

Para llevar a cabo esta tarea se recurrió a distintos experimentos específicamente elegidos de acuerdo a la identidad de los aminoácidos a asignar. De esta manera, se describen las siguientes secciones para aminoácidos alifáticos, aromáticos y casos especiales: N ϵ /H ϵ de argininas y C ϵ /H ϵ de metioninas.

Asignación de Cadenas Laterales Alifáticas

La mayoría de las resonancias pertenecientes a protones y carbonos de cadenas laterales alifáticas se localizaron, navegando a partir de información del esqueleto empleando los espectros 2D ^{13}C -HSQC (que correlacionan núcleos de ^{13}C y ^1H acoplados escalarmente) y dos tipos de HCCH-TOCSYs (del inglés, *Total Correlation Spectroscopy*): H(C)CH-TOCSY y (H)CCH-TOCSY (Kay et al., 1993). Para confirmar las asignaciones y/o identificar resonancias restantes se emplearon espectros 3D ^{13}C -edited [^1H , ^1H]-NOESY. En el H(C)CH-TOCSY se observan correlaciones con todos los hidrógenos alifáticos de la cadena lateral, mientras que en el (H)CCH-TOCSY se observan los desplazamientos químicos de todos los carbonos de la cadena lateral en la tira o *strip* correspondiente a un hidrógeno alifático. En ambos experimentos HCCH-TOCSY la magnetización se transfiere desde los hidrógenos de la cadena lateral al carbono alifático unido. En el H(C)CH-TOCSY la magnetización del protón alifático inicial se deja evolucionar, obteniéndose espectros con dimensiones indirectas ^1H y ^{13}C y una dimensión directa ^1H , mientras que en el (H)CCH-TOCSY el protón inicial sólo se usa para transferir la magnetización y se obtienen dos dimensiones de ^{13}C y la directa de ^1H . La asignación se basó fundamentalmente en el H(C)CH-TOCSY (Figura 4.4), si bien el experimento (H)CCH-TOCSY fue particularmente útil para asignar las resonancias de lisinas que presentaron gran solapamiento en el espectro anterior. As-p18 posee un gran número de lisinas en su estructura primaria, (un total de 18, determinando que sea el residuo más abundante) y dado que sus cadenas laterales cargadas se

encuentran generalmente expuestas al solvente, detectando un entorno similar, es frecuente el solapamiento de señales.

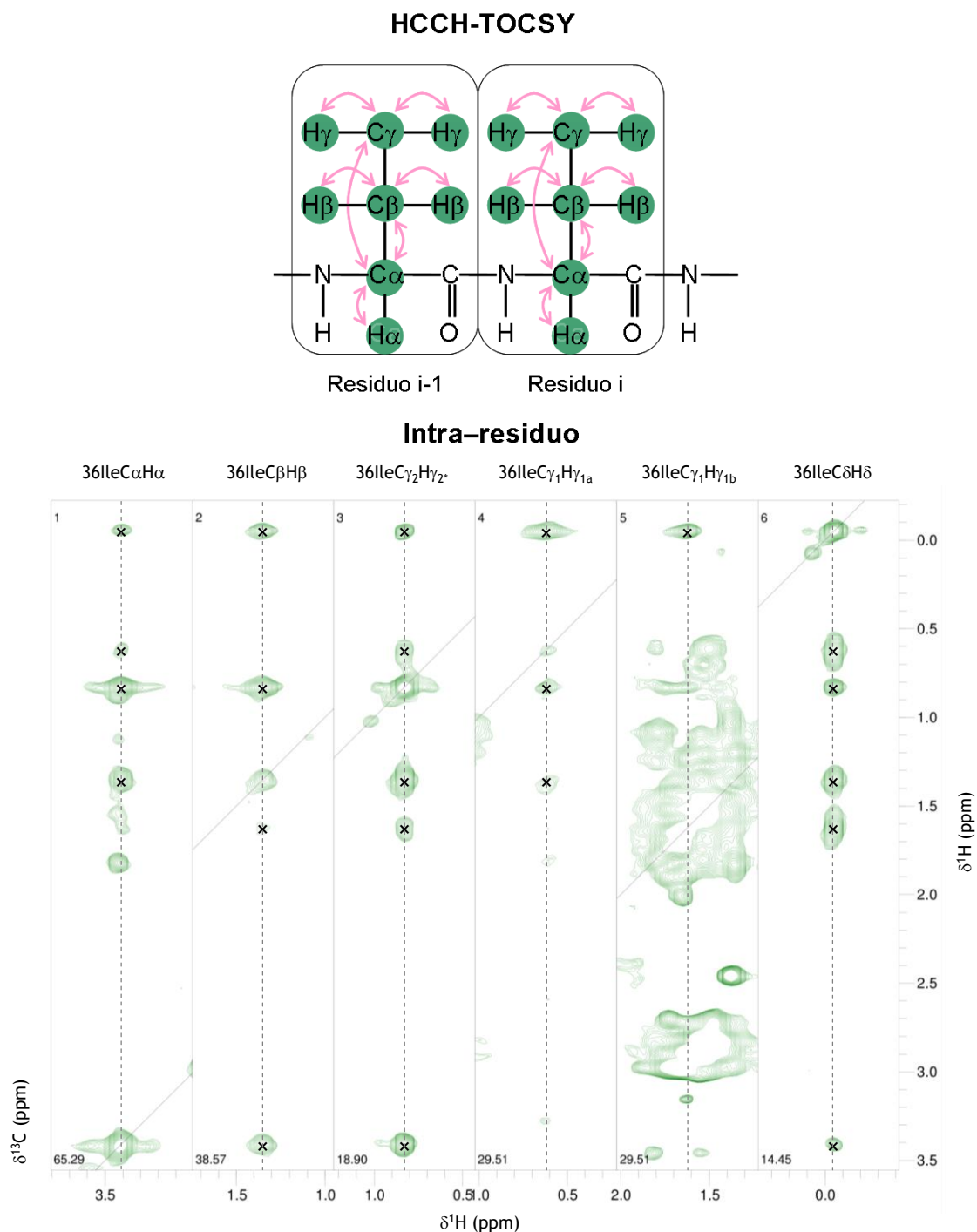


Figura 4.4. Espectro H(C)CH-TOCSY para la asignación de cadenas laterales. Tiras tomadas del espectro H(C)CH-TOCSY que permite asignar la cadena lateral (H α , H β , H γ_{1a} , H γ_{1b} , H γ_2 , H δ). Se muestra la asignación del residuo 36lle.

Asignación de Cadenas Laterales Aromáticas

Las resonancias provenientes de las cadenas laterales aromáticas (H δ 1 de histidinas, H δ 1 de triptofanos, H δ y H ϵ de tirosinas y H δ y H ϵ de fenilalaninas) se asignaron empleando espectros 3D ^{13}C -NOESY y 2D ^{13}C -HSQC con la ayuda de los experimentos 2D (HB)CB(CGCD)HD y 2D (HB)CB(CGCDCE)CE (Yamazaki et al., 1993). En estos últimos experimentos las resonancias provenientes de los H δ y H ϵ , respectivamente, se correlacionan con la resonancia del C β intra-residuo mediante la transferencia de magnetización a través del acoplamiento escalar (Figura 4.5).

Las resonancias restantes se identificaron a partir de espectros ^{15}N NOESY (asignación de N ϵ 1-H ϵ 1 de triptofanos; N δ 1-H δ 1 y N ϵ 2-H ϵ 2 de histidinas) y ^{13}C edited [^1H , ^1H]-NOESY (asignación de C δ H δ y C ϵ H ϵ de aromáticos en general; y C ζ H ζ de fenilalaninas y triptofanos).

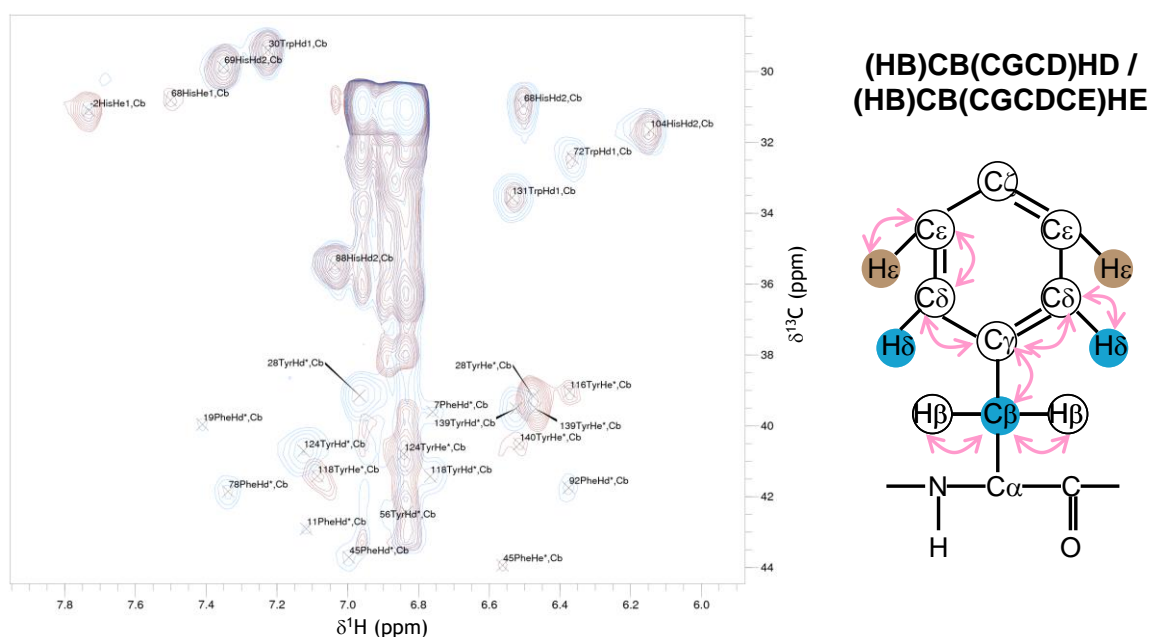


Figura 4.5. Ilustración de la asignación de cadenas laterales aromáticas en As-p18. El espectro 2D (HB)CB(CGCDCE)HE se muestra en marrón, mientras que el espectro 2D (HB)CB(CGCD)HD se muestra en azul. A la derecha, un esquema de las transferencias de magnetización involucradas en los experimentos mencionados.

Asignación de C ϵ /H ϵ de Metioninas y N ϵ /H ϵ de Argininas

Si bien la secuencia nativa de As-p18 posee sólo 4 residuos de metionina, el hecho de que se ubicaban en entornos similares hacía particularmente difícil la asignación de los C ϵ /H ϵ . Para superar esta dificultad se recurrió a experimentos ^{13}C -HSQC editados con evolución en tiempo constante (CT-HSQC, Vuister & Bax, 1992), donde además de

mejorar la resolución de los picos, los mismos aparecen con distinto signo de acuerdo al número par o impar de carbonos vecinos. De esta manera, los C ϵ /H ϵ de las metioninas al no estar vinculadas con ningún carbono, se evidenciaron como señales negativas en una región discreta del espectro.

De manera análoga, para la asignación de N ϵ /H ϵ provenientes de residuos de arginina, se empleó un ^{15}N -HSQC selectivo, mostrando señales en fase exclusivamente para estos núcleos.

Resumen de Asignación Proteica

A partir de los experimentos mencionados todos los residuos de As-p18 fueron asignados, al menos parcialmente, a excepción de los residuos del *His-tag* N-terminal, cuyas resonancias o no se observaron o caían solapadas en los espectros. No se observaron las resonancias amida de los residuos 18Asn y 30Trp, debido a que probablemente se encontraban en intercambio rápido con el solvente. En la Tabla 4.1 se muestra un resumen de la asignación de As-p18 considerando los residuos 1-143 (excluyendo los 12 primeros residuos del *His-tag* N-terminal). Las asignaciones de desplazamiento químico ^1H , ^{13}C y ^{15}N de la cadena principal y cadenas laterales se reportan aquí (Apéndice A) y también se encuentran depositadas en la base de datos BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>), bajo el número de registro 18632.

Tipo de Resonancia	Disponibles	Asignadas	% Asignación
Átomos de Carbono	726	633	87.2
Átomos de Hidrógeno	885	857	96.8
Átomos de Nitrógeno	204	151	74.0
Amidas	282	274	97.2
Esqueleto aminoacídico	568	557	98.1
Esqueleto no-H	429	420	97.9
Hidrógenos cadena lateral	746	720	96.5
No-Hidrógenos cadena lateral	501	364	72.7

Tabla 4.1. Resumen de asignación de As-p18 para los residuos 1-143.

La gran mayoría de las resonancias asignadas exhibió valores de desplazamiento químico dentro de la distribución establecida para cada tipo de átomo en particular (Moseley et al., 2004). Sin embargo, se presentaron algunas excepciones (resumidas en la Tabla 4.2), para las cuales se corroboró la asignación mediante la verificación meticulosa de los datos contribuyentes a la resonancia en cuestión. Un análisis posterior

sobre la estructura de As-p18 permitió racionalizar la mayoría de estos valores inusuales de corrimiento químico. Los desplazamientos químicos atípicos de los residuos 3Leu, 33Arg, 56Tyr, 57Asp, 90Ile, 100Leu, 127Met y 135Ser responden al efecto de las corrientes de anillo determinadas por la proximidad a residuos aromáticos. En el caso de los residuos 6Lys, 26Arg, 66Asp, 77Glu, su participación en la formación de puentes salinos explicaría el corrimiento a valores inusuales. El desplazamiento químico atípico de 18Asn es consistente con la proximidad al átomo de oxígeno de 135Ser unido por puente de hidrógeno al nitrógeno amida de la asparagina. 143Gln está situado en el extremo C-terminal que al presentar un entorno covalente diferente, con sus residuos menos restringidos, también ofrece una explicación lógica para el valor de desplazamiento químico por fuera de la distribución normal.

Resonancia	δ (ppm)	Distribución de Corrimientos Químicos de Referencia (ppm)
3LeuH β_2	0.283	1.27 – 1.95
6LysH γ_a	0.072	1.07 – 1.63
18AsnH β_2	3.945	2.50 – 3.12
26ArgH δ_*	1.929	2.88 – 3.36
33ArgH β_a	0.896	1.52 – 2.06
43LysH δ_a	0.604	1.38 – 1.82
56TyrH β_2	-0.494	2.54 – 3.28
57AspH α	5.743	4.27 – 4.91
66AspH α	5.990	4.27 – 4.91
77GluN	134.430	117.19 – 124.15
90IleH β	-0.232	1.49 – 2.07
90IleH γ_{12}	-0.733	0.88 – 1.68
90IleH γ_{2*}	-0.481	0.50 – 1.04
100LeuH β_2	-0.068	1.27 – 1.95
127MetH γ_a	1.027	2.01 – 2.77
135SerH α	5.894	4.08 – 4.88
143GlnN	132.198	116.29 – 123.49

Tabla 4.2. Resonancias con valores de corrimiento químico atípicos en As-p18. Las distribuciones de desplazamientos químicos de referencia se extrajeron de acuerdo al software que controla valores de desplazamientos químicos inusuales, desarrollado por Moseley et al., (2004).

Predicción de Estructura Secundaria

En una etapa temprana del proyecto, y contando con las asignaciones de la cadena principal de la proteína y de los C β , se realizó una predicción de la estructura secundaria para As-p18. Dicha predicción se obtuvo a partir de las desviaciones de los valores de corrimiento químico de los núcleos de C α , C β , H α , C' y NH comparados con una base de datos de valores para *random coil*. Estos últimos, al provenir de segmentos no estructurados, presentan valores de corrimiento químico independientes del entorno. Por el contrario los aminoácidos que se hallan dentro de un plegamiento proteico, experimentan ciertos patrones estructurales, y en consecuencia también lo hacen sus valores de corrimiento químico. A través del programa *DANGLE* (Cheung et al. 2010) y por intermedio de la extensa base de datos generada por Wishart y Sykes (1994) se obtienen valores de CSI (*Chemical Shift Index*) para cada residuo. Mediante un algoritmo que asigna valores de CSI de -1, 0 ó 1, se infiere la conformación de estructura secundaria más probable. Como se muestra en la Figura 4.6 se vio que As-p18 presentaba los elementos de estructura secundaria que caracterizan a la familia de las FABPs: un arreglo de 10 hebras beta interrumpido por un motivo α -hélice – *loop* – α -hélice, entre la primera y segunda hebra.

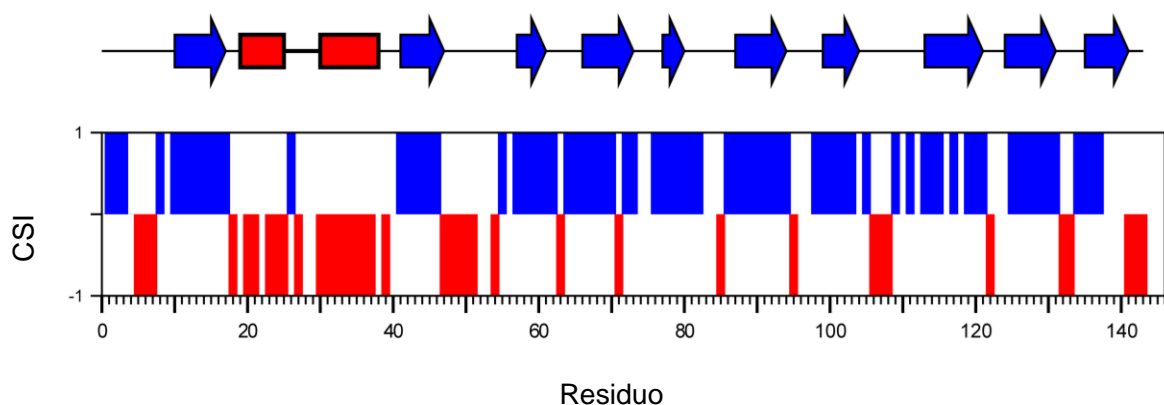


Figura 4.6. Alineamiento de los valores consenso de CSI (barras) con la predicción de elementos estructura secundaria de As-p18. Valores positivos y negativos de CSI indican segmentos de hebras- β y α -hélice, respectivamente. Las flechas azules y los rectángulos rojos representan hebras- β y segmentos α -helicoidales, respectivamente.

Incorporación de Ligando al Programa *CCPNMR Analysis*

Con el objeto de incorporar la molécula de ácido oleico al programa de asignación, se descargaron bajo el código de molécula “OLA” los archivos *ChemComp* y *ChemCompCoord links*, desde la página:

<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/nmr/referenceData/chemCompData.html>

Luego se copiaron los archivos a los directorios donde se encuentra el proyecto (ccp/molecule/ChemComp/ y data/ccp/molecule/ChemComp/) y al de instalación del programa *CCPN* (data/ccp/molecule/ChemCompCoord/).

Por último se modificó el archivo ccpnmr/analysis/core/StructureBasic.py al final de la definición “*getBestChemComp()*”

Asignación de Ligando

Los compuestos químicos como los ácidos grasos poseen numerosas señales de carbonos alifáticos con poca diferencia en corrimiento químico determinando grandes dificultades para su asignación. Sin embargo, la degeneración de las señales y la complejidad de su análisis pueden superarse recurriendo al marcaje isotópico diferencial y a los experimentos de filtro isotópico.

En particular, en este trabajo de Tesis, la estrategia para determinar la posición exacta del oleato (OLA) dentro de la proteína As-p18, implicó el diseño de diversos esquemas de marcado isotópico y variados experimentos que permitieran discriminar las interacciones proteína-ligando.

Los esquemas de marcado isotópico (Figura 4.7) incluyeron las siguientes combinaciones para los complejos proteína-ligando:

- As-p18 enriquecida en ^{13}C y ^{15}N + OLA, abundancia natural.
- As-p18 en abundancia natural + OLA completamente marcado en ^{13}C .
- As-p18 en abundancia natural + OLA marcado en ^{13}C en forma alternada (^{13}C en carbonos pares: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18) (*Sigma-Aldrich*)

A su vez, en algunos casos, también se probó la resuspensión del complejo liofilizado en D_2O , para recabar información sobre hidrógenos cuyas señales cayeran cerca de la señal del agua.

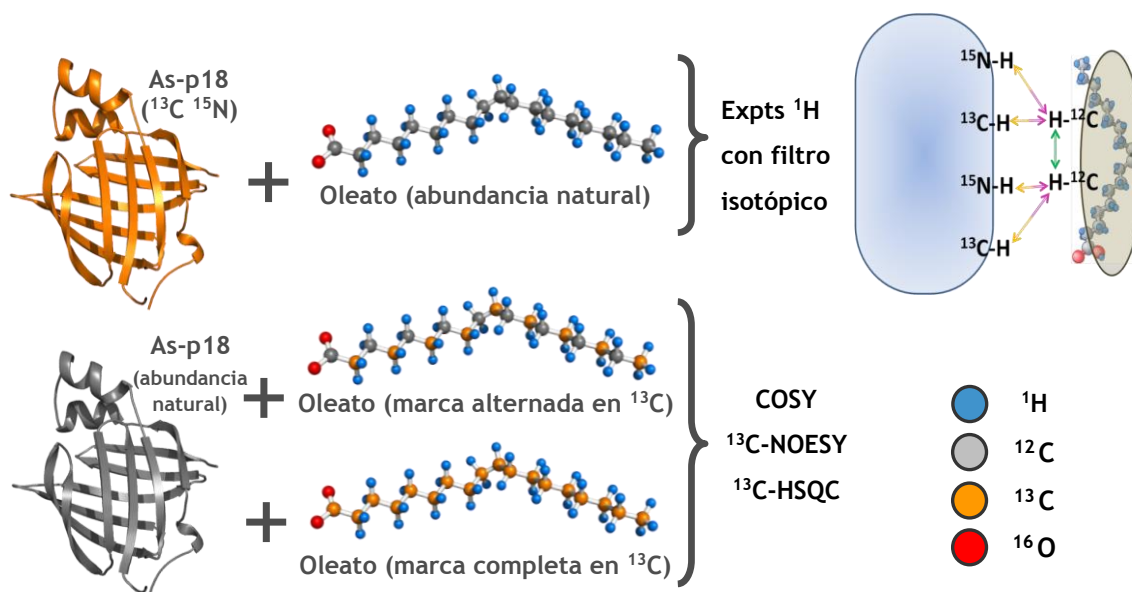


Figura 4.7. Esquemas de marcado isotópico para el complejo As-p18 – oleato. Los complejos proteína marcada – ligando no marcado, se exploraron mediante experimentos de filtro isotópico diagramados arriba a la derecha según Breeze (2000). Suplementariamente se adquirieron experimentos COSY, ^{13}C -NOESY y ^{13}C -HSQC para los complejos proteína no marcada – ligando marcado.

Los experimentos utilizados para estos complejos proteína-ligando comprendieron los usuales de doble y triple resonancia 2D ^{13}C -HSQC y ^{13}C -NOESY-HSQC (Figura 4.8B y C), 3D HccH COSY y aquellos denominados de filtro isotópico. En particular se adquirieron los espectros 2D F1, F2-filtered NOESY, F1-filtered NOESY y F2-filtered NOESY (Ogura, et al. 1996; Breeze, 2000; Iwahara, et al. 2001). Estos aprovechan la marca diferencial entre proteína y ligando, aplicando filtros en las dimensiones indirecta y/o de adquisición, para obtener de forma discriminada aquellas señales que provienen de la interacción ligando \rightarrow proteína; proteína \rightarrow ligando; o ligando \rightarrow ligando (Figura 4.8A).

Mediante estos experimentos fue posible asignar todos los carbonos (excepto el C_5 , el C_9 y el C carboxílico) y sus respectivos hidrógenos. Cabe destacar que gracias a la exhaustiva identificación de todos los núcleos del ligando fue posible establecer correlaciones con las resonancias de la proteína y en una instancia posterior, elucidar la posición del mismo dentro del sitio de unión.

Adicionalmente, los experimentos de filtro isotópico resultaron útiles para la asignación de los siguientes OHs no intercambiables con el solvente: 118Tyr H_η , 62Thr H_{γ_1} , 67Thr H_{γ_1} y 136Thr H_{γ_1} .

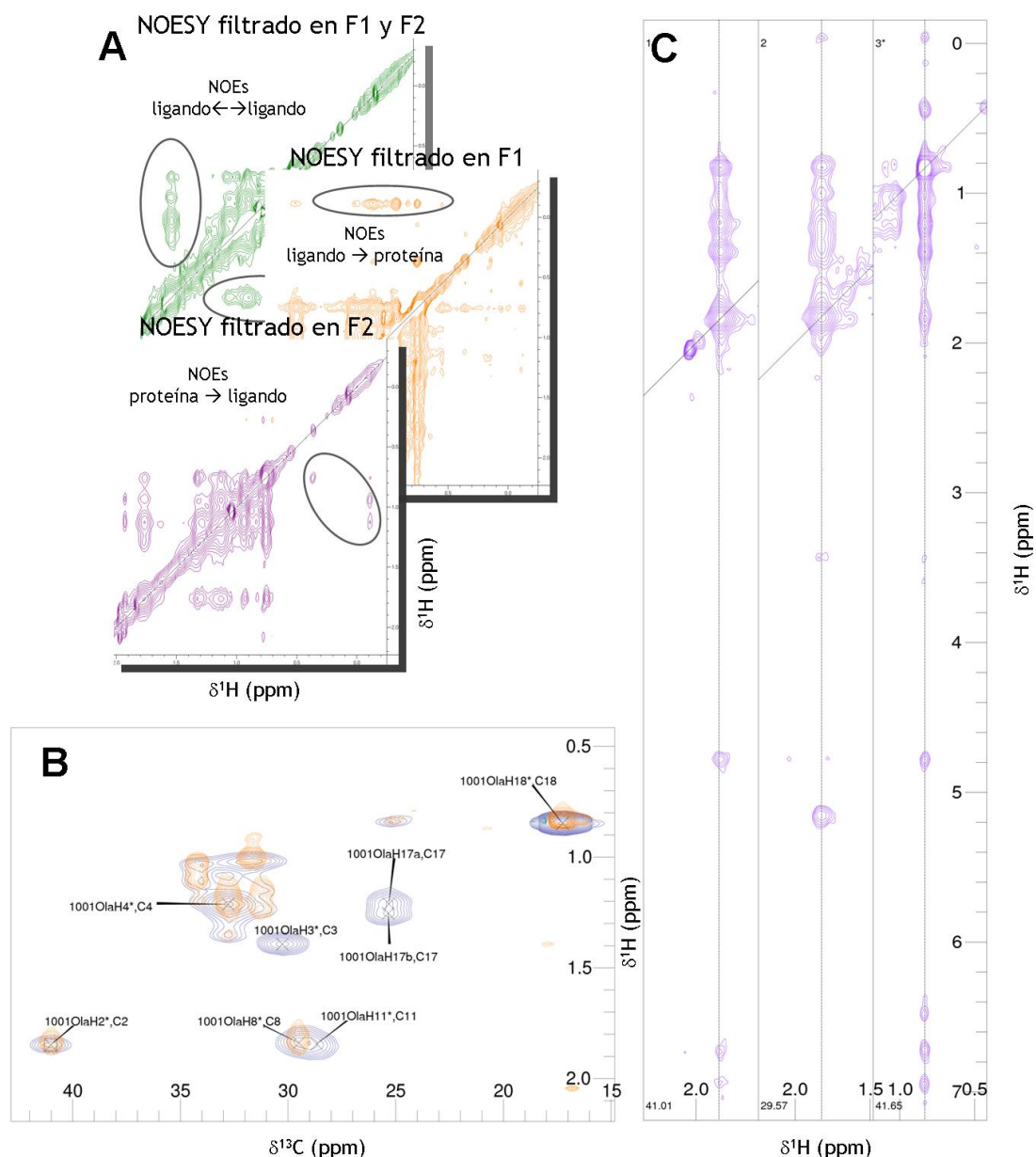


Figura 4.8. Espectros empleados para la asignación de la molécula de oleato y de los núcleos involucrados en la interacción proteína – ligando. A.- Correlaciones dentro del ligando no marcado y NOEs intermoleculares hacia la proteína marcada, selectivamente observados por experimentos de filtro isotópico. B.- Región alifática de dos espectros 2D ^1H - ^{13}C HSQC con los grupos metil y metilen asignados del oleato. La superposición de picos naranjas (marca alternada en carbonos pares) y azules (marca completa) permite diferenciar carbonos pares de impares. C.- Tiras del espectro ^{13}C -NOESY; se muestran los planos de los carbonos C2, C8 y C18 del oleato uniformemente marcado en complejo con proteína no marcada.

4.6 Restricciones Para el Cálculo de Estructuras

Una vez identificados la mayor cantidad posible de núcleos, es posible además de correlacionarlos entre sí, asociarles a distintos parámetros determinados

experimentalmente. De esta manera, se genera una enorme cantidad de pequeñas piezas de información, estrechamente relacionadas con aspectos estructurales, como distancia entre átomos, ángulos de enlace y orientaciones relativas en el espacio.

Al vincular parámetros a un determinado átomo o conjunto de átomos, se pueden definir restricciones, que finalmente se emplearán para el cálculo del modelo tridimensional de la proteína. En este trabajo de Tesis se emplearon distintos tipos de restricciones que se describen a continuación.

Restricciones NOE

La distancia entre dos núcleos de H, inferida a través del efecto Overhauser, constituye uno de los tipos de restricciones más ampliamente utilizadas en la determinación de estructuras por RMN.

Como se detalla en el Capítulo 2, para un sistema simplificado de espines aislados, la intensidad de los NOEs es proporcional a la inversa de la sexta potencia de la distancia internuclear. Sin embargo, en la práctica esta proporción no es del todo exacta debido a los fenómenos de difusión de espín y a los efectos de la movilidad propia de la proteína. Para la determinación estructural de As-p18, las restricciones NOE se extrajeron a partir de los espectros 3D ^{13}C -NOESY-HSQC y 3D ^{15}N -NOESY-HSQC (Sklenar et al., 1993). Utilizando un tiempo de mezcla de 100 ms se pudo alcanzar un balance adecuado entre la intensidad de los *cross peaks* y un efecto de difusión de espín tolerable (Cavanagh, 1996).

La selección de los *cross peaks* se realizó manualmente. El meticuloso análisis durante el “*Peak-picking*” minimizó la posibilidad de seleccionar artefactos que pudieran provocar errores significativos durante las etapas iniciales del cálculo. Esta labor de discriminación se realizó inspeccionando las simetrías de correlación para los *cross peaks*, en cortes ortogonales del mismo espectro, como así también en espectros distintos. De esta manera pudo excluirse a los picos de ruido, artefactos productos de la incompleta supresión del agua, del procesamiento de los espectros y de la recuperación incompleta de la relajación longitudinal.

Durante la asignación de los picos NOE se pretendió identificar, al menos parcialmente, al par de núcleos de H implicados en la interacción dipolar que origina cada señal. Sin embargo se deben considerar algunas cuestiones que complican esta tarea. Por un lado, debido al gran número de núcleos de hidrógeno presentes en una proteína, muchos de ellos poseen valores de corrimiento químico muy similares o indistinguibles dentro del

error que acompaña a la posición de la señal. Por otra parte, pueden aparecer picos que sean producto de superposición de señales. Como premisa general se procuró una asignación conservadora, prefiriendo dejar sin asignación a identificar un *cross peak* erróneamente.

De esta manera se presentaron tres situaciones distintas:

Únicamente cuando se contaba con evidencia certera, para una minoría de *cross peaks* de los espectros NOESY de As-p18, se asignaron manualmente las 3 dimensiones.

Para la mayoría de los *cross peaks* NOE pudo asignarse la dimensión directa de H y la del heteronúcleo al que se haya enlazado, gracias a la información de CS acumulada en los otros experimentos; pero dejando la dimensión indirecta de H sin asignación.

Una tercera situación incluyó *cross peaks* para los cuales no fue posible contar con una asignación segura en ninguna dimensión.

A continuación, empleando las herramientas de la plataforma de *CCPNMR Analysis*, se generaron las restricciones de distancia. Para aquellos *cross peaks* completamente asignados se generaron restricciones inequívocas, mientras que para el resto de los casos se generaron restricciones ambiguas que contemplaron un rango de posibilidades de asignación. Los rangos de frecuencia en los que los desplazamientos químicos de un *cross peak* NOE pueden ser potencialmente asignados se definen por el valor de tolerancia, Δ . En los espectro 3D NOESY, si las resonancias de frecuencia de un *cross peak* NOE son {F1, F2, F3}, se le asignarán a ese *cross peak* dado todos los desplazamientos químicos entre $F-\Delta$ y $F+\Delta$. El valor de tolerancia debe elegirse logrando un compromiso entre un rango de asignaciones posibles que incluya al correcto, pero que no sea tan grande que ocasione una gran degeneración en la asignación, dificultando así la convergencia de las estructuras calculadas. Para As-p18, las tolerancias correspondientes a las dimensiones directa e indirecta de protón y del heteronúcleo se fijaron en 0.05, 0.05 y 0.3 ppm respectivamente.

Además de la identidad de los núcleos involucrados en el *cross peak* NOE, interesa establecer una relación entre la intensidad y la distancia internuclear. Para ello, la intensidad de cada *cross peak* NOE se normalizó en base a la intensidad promedio de todos los NOEs, y de acuerdo esta la intensidad normalizada se clasificaron en distintos grupos (v.g. fuerte, medio, débil, muy débil). A estos grupos o “*distance bins*” se les asoció a un rango de distancia con un límite superior definido de manera empírica. Esta aproximación, donde se establecen clases de distancias en lugar de un valor preciso de distancia para cada NOE, resulta aceptable como punto de partida. Como se explica más

adelante, en una etapa posterior, durante las sucesivas iteraciones en el proceso de cálculo, las restricciones se recalibran refinando la distribución de intensidad-distancia, por lo que la calibración inicial no es crítica.

Restricciones de Ángulos Diedros

Cuando se recolecta una cantidad suficiente de restricciones de distancia de largo alcance, la información adicional que puedan aportar las restricciones de ángulos diedros resulta de poca relevancia. Sin embargo, cuando los datos experimentales son escasos o muy ambiguos, las restricciones de ángulos diedros juegan un papel importante, demostrando aumentar la precisión y la exactitud de las estructuras resultantes. Para generar dichas restricciones, en este trabajo de Tesis se utilizó el programa *DANGLE* dentro de la plataforma del programa *CCPNMR Analysis*.

DANGLE (Dihedral ANGles from Global Likelihood Estimates) predice los ángulos ψ y ϕ de la cadena principal, así como elementos de estructura secundaria exclusivamente a partir de la secuencia de aminoácidos, los desplazamientos químicos experimentales y de una base de datos de proteínas de estructuras conocidas y sus desplazamientos asociados. El enfoque que utiliza *DANGLE* se basa en una lógica de inferencia bayesiana (Cheung et al., 2010) que analiza la probabilidad de conformaciones a través del mapa de Ramachandran, poniendo especial atención en las distribuciones de población esperadas para los diferentes tipos de residuos aminoacídicos.

Dado que *DANGLE* realiza sus predicciones a partir de una base de datos de estructuras conocidas, la exactitud de las mismas depende de la representatividad de esta última. De esta manera, una conformación de la cadena principal sub-representada en la base de datos puede dar lugar a restricciones inadecuadas durante los cálculos de estructura. A fin de evitar este efecto, las 236 restricciones de ángulos diedros se utilizaron en los pasos de alta temperatura de cada procedimiento de cálculo –favoreciendo de este modo la convergencia–; y se omitieron durante los pasos de enfriamiento final (ajustando la constante de fuerza a cero), evitando así cualquier sesgo en las estructuras calculadas.

4.7 Restricciones Para el Refinamiento de Estructuras

En una etapa más avanzada del proyecto, y con la finalidad de mejorar la definición del conjunto de estructuras, se incorporaron restricciones de acoplamientos dipolares residuales (RDC) y de puentes de hidrógeno.

Restricciones RDC

Como se detalla en el Capítulo 2, los RDC proveen información respecto a la orientación de vectores internucleares y son ampliamente utilizados durante la determinación y refinamiento de estructuras de proteínas en solución (Gronenborn, 2002). Mientras que los NOE representan restricciones locales de distancia, los RDC proporcionan información orientacional de largo alcance, la cual es particularmente útil en el caso de estructuras con grandes cavidades como las FABPs.

Para el registro de los RDC es requisito que la muestra de proteína se encuentre débilmente alineada respecto al campo magnético aplicado. Este alineamiento parcial se logra introduciendo la muestra en un medio que se encuentre fuertemente orientado respecto del campo magnético externo, pero que presente una escasa interacción con la muestra. En la literatura se reportan diversos medios que pueden cumplir esas condiciones (Chen & Tjandra, 2012; Lipsitz & Tjandra, 2004). Sin embargo, en la elección del medio de alineamiento hay que considerar las propiedades particulares y condiciones de aplicación óptimas que cada uno posee. Para el caso de As-p18 la selección del medio no fue trivial. Reportes previos para otra proteína de la familia de las FABPs indicaban que, como era de esperar por su naturaleza química, las bicelas no eran apropiadas como medio anisotrópico ya que los complejos FBP-ligando tendían a liberar los ácidos grasos en un equilibrio de partición con el medio de alineación (He et al., 2007). Por su parte, el grupo de Eliseo y colaboradores había logrado extraer RDCs para una Lb-FBP en su forma holo utilizando partículas de bacteriófagos pf1 (Eliseo et al., 2007). Siendo que este medio anisotrópico ya había sido empleado con éxito en el laboratorio del Dr. Smith, fue la primera opción contemplada para obtener información relacionada con la orientación relativa de segmentos muy separados en la estructura proteica. Una ventaja que ofrece este medio es que, dada la relación lineal entre ellos, el grado de alineación se puede moderar mediante el simple ajuste de la concentración de fagos (Hansen et al., 1998). De esta manera, el grado de alineación se evalúa siguiendo la disociación que presentan las señales de núcleos cuadrupolares como las del deuterio (presente en todas las muestras de RMN a las cuales se les agrega un porcentaje de D₂O), mediante un experimento 1-D y haciendo uso de los valores reportados en la literatura.

Para la recolección de los RDCs, una muestra de holo-[¹³C,¹⁵N]-As-p18 se alineó parcialmente utilizando una concentración final de fagos de 20 mg/mL. En estas condiciones se registró una disociación adecuada de ~10 Hz para las señales de ²H. Sin

embargo, no fue posible extraer información alguna debido a que la proteína se encontraba excesivamente alineada, incluso cuando se testearon diversas condiciones de fuerza iónica, pH y medios (Tabla 4.3). Puesto que el punto isoeléctrico predicho para As-p18 es particularmente alto (8.83, según <http://workbench.sdsc.edu/>), las probables interacciones electrostáticas entre los bacteriófagos, cargados negativamente y la proteína, cargada positivamente a los pH de trabajo, determinaron que se consideraran medios anisotrópicos alternativos.

La siguiente opción consistió en inducir el alineamiento parcial mediante el uso de geles de poliacrilamida comprimidos. En este medio, el grado de alineamiento de la proteína está determinado por la fuerza con la que se comprime mecánicamente el gel, lo que permite re-escalar a voluntad los RDCs (Tycko et al., 2000).

Se testearon múltiples condiciones, variando la proporción de acrilamida, la carga (mediante la adición de APTMAC (Cierpicki & Bushweller, 2004)), y el diámetro del gel, las cuales se resumen en la Tabla 4.3. Acorde al grado apropiado de alineamiento del medio y a la calidad y sensibilidad de los espectros, se seleccionó al gel de poliacrilamida 5 %, 6mm de diámetro, comprimido en forma radial.

Los datos de acoplamientos se recolectaron a través de un experimento del tipo *IPAP J-coupled* ^{15}N HSQC, que se adquirió bajo condiciones isotrópicas como anisotrópicas. A partir de estos experimentos se extraen los acoplamientos escalares solos (J) y sumados a los dipolares residuales (J+D), respectivamente (Ottiger et al., 1998). Primeramente se procuró obtener las restricciones de los acoplamientos dipolares $^1\text{D}_{\text{NH}}$, $^1\text{D}_{\text{NC'}}$, $^1\text{D}_{\text{C'Ca}}$ y $^1\text{D}_{\text{CaHa}}$ mediante los experimentos HSQC-NH-IPAP, HSQC-AB-NCO, HSQC-AB-CACO y J-CAHA-BIRD. Sin embargo debido a la baja sensibilidad de las señales, sólo se pudo trabajar con el espectro HSQC-NH-IPAP. Los valores de J y J+D se obtuvieron a través del macro para cálculo de RDC (Dr. Graham Ball, University of Edinburgh) dentro de la plataforma del *CCPNMR Analysis*, para finalmente obtener los valores de D de los grupos amida de As-p18. Para estimar el tensor de alineamiento $^1\text{D}_{\text{NH}}$ se empleó el programa PALES (<http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/PALES/>), a partir del cual se extrajeron los componentes axial, $A_a=3.90$ Hz y rómbico, $R=0.46$. Como resultado se obtuvieron un total de 113 acoplamientos dipolares $^1\text{D}_{\text{NH}}$ que fueron incorporados al los cálculos de estructura mediante el potencial SANI (Tjandra et al., 1997).

Fago Pf1/Condición	Acrilamida (%)	Diametro (mm)	APTMAC (%)	Resultado/Separación señal deuterio
Pf1	-	-	-	Señal proteica disminuida por unión a fagos
Pf1 + 150 mM NaCl	-	-	-	Señal proteica disminuida por unión a fagos
Pf1 + 150 mM NaCl + 50 mM D4 imidazol	-	-	-	Señal proteica disminuida por unión a fagos
Pf1 + 150 mM NaCl + 250 mM D4 imidazol	-	-	-	Señal proteica disminuida por unión a fagos
Pf1 + 300 mM NaCl + 250 mM D4 imidazol	-	-	-	Señal proteica disminuida por unión a fagos
Idem condición previa + pH alcalino	-	-	-	Señal proteica disminuida por unión a fagos
compresión radial	5	5	-	Señal deuterio sin separación
compresión radial	5	7	-	Señal deuterio sin separación
compresión radial	5	6	-	Señal deuterio separación ~3.4 Hz
compresión axial	5	6	-	Señal deuterio sin separación
compresión radial	7	5	-	Señal deuterio sin separación
compresión radial	5	5	5	Señal deuterio sin separación
compresión radial	5	4	10	Señal deuterio sin separación

Tabla 4.3. Resumen de las condiciones de alineación testeadas para obtener RDCs.

Restricciones de Puente de Hidrógeno

Se realizaron ensayos de intercambio H/D, para determinación de puentes de hidrógeno en la cadena aminoacídica principal; que proveyeron de restricciones adicionales para el refinamiento de las estructuras.

Los protones amida del backbone involucrados en puentes de hidrógeno se identificaron, estimando la tasa de intercambio con el solvente cuando una muestra liofilizada de [^{15}N]-As-p18 se disolvió en 600 μL de D_2O (concentración final ~ 0.7 mM). Aquellos hidrógenos que se encontraban accesibles al solvente se intercambiaron rápidamente con el deuterio, pero aquellos que estaban involucrados en puentes de hidrógeno o se hallaban enterrados en el interior del *core* hidrofóbico, lo hicieron muy lentamente. Mediante la adquisición en serie de experimentos ^{15}N -HSQC (Figura 4.9) tomados a intervalos regulares de 20 min (para los primeros 7 experimentos; y una vez que no se registraron diferencias apreciables, 2 experimentos luego de 18 horas), se

evaluaron aquellos hidrógenos cuyas señales permanecieron evidentes a lo largo del tiempo y se identificaron de forma inequívoca a los átomos aceptores en el puente de hidrógeno, con la ayuda de las estructuras obtenidas hasta el momento y de los espectros NOE. Las restricciones provenientes de estos datos se implementaron como dos restricciones de distancia: la primera entre un protón del grupo dador amida y el oxígeno del grupo aceptor carbonilo (con límites inferior y superior de 1.7 y 2.2 Å, respectivamente); y la segunda entre el nitrógeno amida dador y el oxígeno del grupo carbonilo aceptor (con límites inferior y superior de 2.7 y 3.2 Å, respectivamente). Como resultado de este análisis se obtuvieron 108 restricciones de puente de hidrógeno.

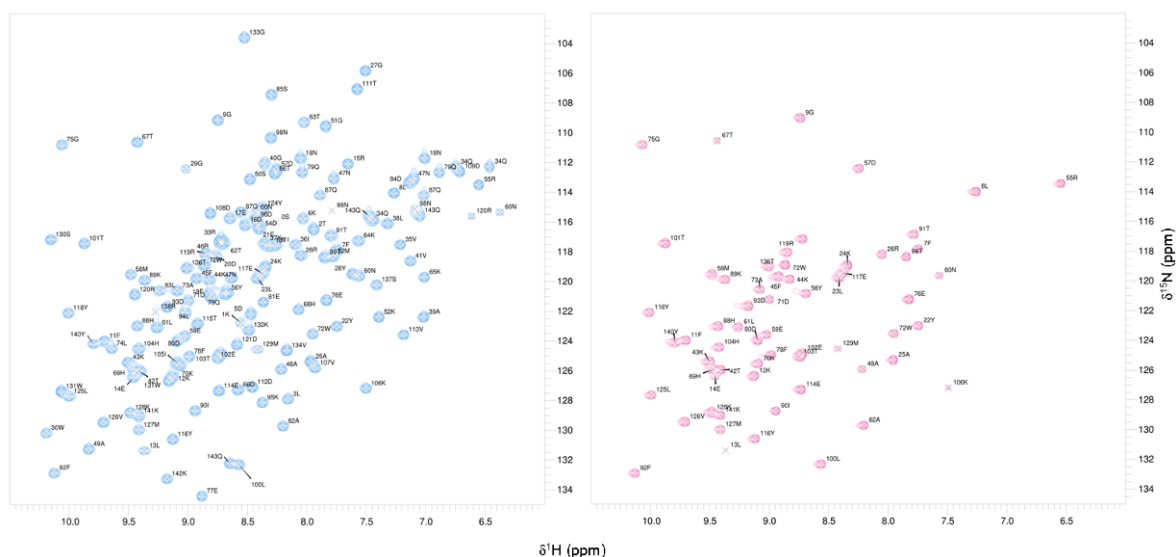


Figura 4.9. Espectros de As-p18 durante el intercambio H/D. Espectros ^{15}N HSQC que permitieron la identificación de los protones amida involucrados en uniones puente de hidrógeno. En azul, As-p18 antes del intercambio. En rosa, espectro adquirido luego de 30 minutos de la dilución en D_2O .

Como se ve en la Tabla 4.4, el patrón que describen los protones amida de intercambio lento identificados experimentalmente es consistente con la estructura de hoja beta antiparalela característica de las FABPs. Adicionalmente, se corroboró la ausencia de puentes de hidrógeno entre la cadena principal de los segmentos correspondientes a las hebras β D y β E, que constituye otro rasgo particular de las FABPs denominado como “*gap region*” (Sacchettini et al., 1989).

Amida Dador	Carbonilo Aceptor	Amida Dador	Carbonilo Aceptor
7Phe	4Pro	82Ala	86Thr
8Leu	5Asp	88His	80Asp
9Gly	45Phe	89Lys	105Ile
11Phe	43Lys	90Ile	78Phe
12Lys	142Lys	91Thr	103Thr
22Tyr	18Asn	92Phe	76Glu
23Leu	20Asp	93Asp	101Thr
24Lys	20Asp	99Thr	96Asp
25Ala	21Glu	100Leu	118Tyr
26Arg	22Tyr	101Thr	93Asp
42Thr	61Leu	102Glu	116Tyr
43Lys	11Phe	103Thr	91Thr
44Lys	59Glu	104His	114Glu
45Phe	9Gly	114Glu	104His
48Ala	55Arg	116Tyr	102Glu
57Asp	46Arg	117Glu	128Lys
58Met	69His	118Tyr	100Leu
59Glu	44Lys	119Arg	126Val
61Leu	42Thr	125Leu	140Tyr
69His	58Met	126Val	119Arg
70Lys	68His	127Met	138Arg
72Trp	56Tyr	128Lys	117Glu
75Gly	92Phe	129Met	136Thr
76Glu	73Ala	136Thr	129Met
78Phe	90Ile	140Tyr	125Leu
80Asp	88His	141Lys	12Lys

Tabla 4.4. Residuos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno. Los grupos dadores amida se identificaron a partir de los experimentos de intercambio H/D. Los grupos aceptores carbonilo se determinaron en base al análisis de las estructuras hasta ese momento calculadas y a los espectros NOE.

4.8 Restricciones Proteína-Ligando

Como resultado de la estrategia de marcado y de los variados experimentos para asignar las señales del oleato (OLA) y sus interacciones con As-p18, se obtuvieron 16 restricciones inequívocas. Éstas involucraron a algún núcleo de H de la molécula de ácido oleico vinculado a un H perteneciente a los residuos proteicos 19Phe, 23Leu, 28Tyr, 32Met, 36Ile, 84Asp (ver Apéndice C). Adicionalmente se recabaron un gran

número de restricciones ambiguas. Para estas restricciones no fue posible discriminar un único par de resonancias contribuyentes, debido al solapamiento de señales y en particular a la gran similitud entre los valores de corrimiento químico de muchos de los núcleos de la molécula de ligando y de núcleos propios de la proteína, que eran a su vez candidatos de asignación por proximidad. Más allá de las contribuciones múltiples en los *cross peaks* NOE, fue posible rastrear a los residuos que participaban en estas restricciones ambiguas. Estos incluyeron: 22Tyr, 23Leu, 35Val, 41Val, 62Thr, 64Lys, 65Lys, 83Leu, 114Glu, 116Tyr, 127Met, 129Met, 140Tyr.

4.9 Cálculo de Estructuras

Una vez recolectados los conjuntos de restricciones, estos se emplean como datos de entrada para el cálculo de estructuras. Los programas de cálculo utilizados en RMN integran, mediante distintos algoritmos, la información empírica sobre la topología y geometría de las proteínas en general; con las restricciones experimentales generadas a partir del análisis de los espectros de RMN. El proceso mediante el cual se generan los modelos estructurales, involucra sistemas de dinámica molecular que apuntan a la minimización de sus energías (Rieping et al., 2007). A fin de evitar mínimos locales, frecuentemente se recurren a estrategias inspiradas en el *Annealing Simulado* (Kirkpatrick et al., 1983), donde la energía cinética que permite superar las barreras energéticas se retira del sistema lentamente, permitiendo que evolucione a estructuras energéticamente favorables. Al mismo tiempo, se van ponderando las constantes de energía de las restricciones experimentales. El proceso de cálculo es iterativo y concluye con un conjunto de modelos que mejor satisfacen las restricciones experimentales, que no reducen más allá su energía y que convergen entre sí.

En este trabajo se utilizó el programa *ARIA* (*Ambiguous Restraints for Iterative Assignment*) en su versión 2.3 (Nilges, 1995).

Dinámica Molecular Restringida con Enfriamiento Lento

Como se comentó brevemente, la información experimental de RMN, debe suplementarse con restricciones empíricas que propendan a una correcta estructura covalente, contemplando distancias y ángulos de enlace y demás elementos estándares de la geometría proteica. Para integrar toda esta información, *ARIA* hace uso de la Dinámica Molecular Restringida, empleando un Enfriamiento Lento. Este enfoque está inspirado en la técnica del *Annealing Simulado*, donde el sistema se enfría muy

lentamente a fin de explorar una gran variedad de conformaciones, logrando una alta probabilidad de arribar eventualmente a la estructura correcta. *ARIA* trabaja con el *software* CNS (*Crystallography and NMR system*; Brunger et al., 1998), empleando el campo de fuerza PARALLHDG-5.3 con los parámetros no-covalentes de PROLSQ (Linge & Nilges, 1999), y haciendo uso de la dinámica de ángulos de torsión. Las condiciones establecidas para el proceso de Dinámica con Enfriamiento Lento se adaptaron a fin de facilitar la convergencia de las estructuras calculadas (Tabla 4.5).

Etapa	Temperatura (K)	Pasos
Alta temperatura	10000	20000
Refinamiento	2000	8000
Enfriamiento 1	1000	10000
Enfriamiento 2	50	8000

Tabla 4.5. Resumen de las condiciones de la Dinámica Molecular Restringida con Enfriamiento Lento.

Intercambio Proquiral

En proteínas los grupos proquirales tienen un centro de carbono unido a dos sustituyentes distintos y dos iguales (por ejemplo, como sucede en los carbonos β y γ de valinas y leucinas, respectivamente). Los sustituyentes idénticos con desplazamientos químicos no degenerados suelen asignarse estereoespecíficamente, de forma arbitraria, durante el proceso de asignación. Esta asignación arbitraria puede traer aparejado una orientación incorrecta en el par proquiral seleccionado. Para superar este problema, se trabajó con una asignación de quiralidad flotante. Esto permite que los dos desplazamientos químicos no degenerados, se asignen a cualquiera de los sustituyentes del par proquiral mediante el intercambio de sus asignaciones estereoespecíficas durante el cálculo (Habeck et al., 2004). Finalmente se selecciona para cada centro proquiral, el conformero de energía más bajo.

Restricciones Ambiguas

Como se mencionó, las restricciones provenientes de los espectros NOESY representan una fuente primaria de información estructural. Pero para emplear de forma efectiva estas restricciones de distancia es necesario identificar a los núcleos involucrados. Debido las dificultades comentadas previamente, es prácticamente imposible asignar de

manera inequívoca y completa todos los *cross peaks* de los espectros NOE, determinando que las restricciones de distancia posean un carácter ambiguo. Para superar esta situación, durante el proceso de cálculo *ARIA* somete a las restricciones generadas en *CCPNMR Analysis* a un proceso de filtrado, donde tanto las restricciones provenientes de *cross peaks* completamente asignados como de parcialmente o no asignados son reanalizadas en el contexto de las estructuras que se van calculando. De esta manera, se reduce el riesgo de generar asignaciones erróneas que pudieran sesgar el cálculo. *ARIA* combina todas las posibilidades de asignaciones alternativas en una restricción y selecciona sólo los pares de resonancias contribuyentes correctos, mediante la generación iterativa de estructuras y el análisis de violaciones. De esta manera, se converge a un conjunto de plegamientos con asignaciones NOE consistentes.

Cálculo Iterativo

ARIA emplea una estrategia iterativa para el cálculo de estructura (Habeck et al., 2004). En la iteración 0, a partir de una estructura al azar, se realiza un cálculo preliminar utilizando todas las restricciones, tanto ambiguas como inequívocas. A continuación, en la iteración 1 se comienza analizando un número predefinido de Estructuras Seleccionadas (en este caso, 10), que alcanzaron los valores más bajos de energía durante la iteración 0. Se examinan las restricciones de distancia, identificando aquellas que caen por fuera del límite de tolerancia como violaciones, las cuales probablemente se deben a asignaciones erróneas o señales de ruido. A fin de reducir el número de posibilidades de asignación de una restricción ambigua, se eliminan aquellas cuya contribución parcial a la intensidad total del *cross peak* NOE se encuentre por debajo la fracción establecida por el Filtro de Asignación Parcial. Durante las sucesivas iteraciones, estos procesos se repiten con límites cada vez más rigurosos para los valores del Filtro de Asignación Parcial y la Tolerancia de Violación (Tabla 4.6).

Los cálculos llevados a cabo durante las 8 iteraciones se realizaron *in vacuo*. Esta simplificación de las interacciones no-covalentes, en conjunto con la falta de contacto con el solvente, puede traer aparejado la aparición de artefactos tales como un empaquetamiento irreal de las cadenas laterales o la presencia de aceptores/dadores de puente de hidrógeno no satisfechos. Para subsanar esto, se incluyó una etapa, a continuación de la iteración 8, donde *ARIA* refinó las 20 estructuras finales en presencia de solvente explícito. Para cada estructura final, *ARIA* calculó una trayectoria corta en un campo de fuerza con dinámica molecular incluida, incorporando además potenciales

electrostáticos y de Lennard-Jones (Linge et al., 2003).

It	Restricciones de Distancia	Número de Estructuras	Criterio de Selección	Estructuras Seleccionadas	Tolerancia de Violación (Å)	Umbral de Violación	Filtro Asignación Parcial	Otras Restricciones
0	Todas	40	Energía Total	10	10	0.5	1.0	Áng Diedros, PdeH
1	Filtradas de it 0	40	Energía Total	10	5.0	0.5	0.9999	Áng Diedros, PdeH, RDC
2	Filtradas de it 1	40	Energía Total	10	3.0	0.5	0.999	Áng Diedros, PdeH, RDC
3	Filtradas de it 2	40	Energía Total	10	1.0	0.5	0.99	Áng Diedros, PdeH, RDC
4	Filtradas de it 3	40	Energía Res Exp	10	1.0	0.5	0.98	Áng Diedros, PdeH, RDC
5	Filtradas de it 4	40	Energía Res Exp	10	1.0	0.5	0.97	Áng Diedros, PdeH, RDC
6	Filtradas de it 5	40	Energía Res Exp	10	0.1	0.5	0.96	Áng Diedros, PdeH, RDC
7	Filtradas de it 6	100	Energía Res Exp	20	0.5	0.5	0.95	Áng Diedros, PdeH, RDC
8	Filtradas de it 7	100	Energía Total	20	0.5	0.5	0.95	Áng Diedros, PdeH, RDC

Tabla 4.6. Protocolo iterativo para el cálculo estructural de As-p18 en ARIA. Res Exp= Restricciones Experimentales, Áng Diedros= Restricciones de Ángulos Diedros, RDC= Restricciones RDC, PdeH=Restricciones de Puente de Hidrógeno.

Inclusión de la Molécula del Ligando en el Proceso de Cálculo

A fin de resolver el complejo As-p18-ácido oleico, fue necesario incorporar a la molécula de ligando en el proceso de cálculo. Primeramente, se generaron archivos con las definiciones de parámetros y topología correspondientes al ligando (Apéndice C). Luego, se incorporaron al campo de fuerza *PARALLHDG5.3* y al archivo *atomnames.xml*, necesario para que *ARIA* reconozca al ligando. Como se detalla en la sección anterior, el punto de partida en el proceso de cálculo, es una estructura al azar. Debido a la nomenclatura utilizada en *CCPNMR Analysis*, donde la molécula de ácido oleico lleva como número de residuo que lo identifica al “1001”, el punto de partida sitúa por defecto al ligando a varias decenas de Angstroms de la proteína (en la iteración 0 la coordenada en el eje X está definida por el ID del residuo). En una etapa inicial, en donde se contaba con un número moderado de restricciones se obtuvieron estructuras

donde As-p18 y el ácido oleico se encontraban en proximidad, en concordancia con la evidencia experimental. Sin embargo, al aumentar el número de restricciones a lo largo de sucesivas rondas de cálculo, se llegó a una condición crítica a partir de la cual el ligando no convergía más con la proteína. Una explicación plausible para esto es que al acumular un número grande de restricciones el sistema se acelerara fuertemente, luego la condición de temperatura constante escalaría las velocidades de nuevo, determinando que el ligando nunca se aproxime a la proteína. Para superar esta dificultad emergente, se reconfiguró como punto de partida una estructura obtenida de cálculos anteriores, donde la proteína y el ligando se hallaban en proximidad. Esta operación resultó válida y confiable ya que la estructura plantilla de partida proviene de un cálculo previo y no de un modelo de *docking* que pudiera presentar algún sesgo. Adicionalmente, al inicio de cada cálculo de estructura se asignan velocidades aleatorias a todos átomos.

Análisis de Restricciones

Generalmente, los primeros conjuntos de estructuras no satisfacen muchas de las restricciones experimentales ingresadas para el cálculo. Estas restricciones experimentales rechazadas que no se acomodaron en el modelo calculado, representan violaciones cuyo listado puede exportarse al programa *CCPNMR Analysis* para su posterior estudio.

Algunas de las causas más comunes que dan lugar a violaciones incluyen la selección de señales espurias como verdaderas, los errores en la asignación o la falta de ella para algunas resonancias hasta ese momento no identificadas, y la incorrecta calibración de las restricciones NOE, entre otras. Todos estos aspectos fueron explorados minuciosamente luego de cada ronda de cálculo: los picos de ruido se eliminaron y se incorporaron más experimentos que ayudaran a asignar resonancias cuya identidad hasta el momento, fuera ambigua o desconocida. De esta manera, se fue refinando la información experimental. Al mismo tiempo, se adecuaron distintos parámetros en *ARIA*, como los límites superior e inferior utilizados durante la recalibración de las restricciones NOE (valor final 0.20) y el punto de corte de la distancia de calibración (valor final 7 Å). Finalmente, y luego de sucesivos ciclos de cálculo, las estructuras resueltas fueron convergiendo y minimizando su energía.

4.10 Validación de la Estructura

El conjunto de estructuras calculadas para As-p18 proporciona modelos que mejor satisfacen las restricciones experimentales, a la vez que respetan la geometría de la estructura covalente proteica, exhibiendo valores de energía aceptables. Todos estos aspectos son revisados durante el proceso de validación que evalúa la calidad de las estructuras y la consistencia del modelo en términos estadísticos.

Selección de Estructuras o *Ensemble*

Una característica de la determinación de estructuras por RMN es que las restricciones empleadas durante el cálculo consideran *rangos* más que valores concretos para distancias, ángulos, etc. En consecuencia el resultado al que se arriba no es una estructura única, sino más bien una familia de confórmeros (o *ensemble*) que satisfacen los datos experimentales de una manera igualmente satisfactoria.

Para la elección de los confórmeros que integrarán el *ensemble* existe más de un criterio. Si bien no existe un consenso, los dos métodos más utilizados se basan o bien en el número de violaciones de restricciones experimentales o en la energía que reporta cada modelo (Spronk et al., 2004). Siguiendo este último criterio, pueden seleccionarse aquellos modelos cuyas energías estén por debajo de un punto de corte arbitrario. En el último paso de iteración durante el cálculo de As-p18 *in vacuo*, pudo observarse que la energía no presentaba un aumento significativo para los 60 primeros modelos (Figura 4.10). De esta manera se seleccionaron los 20 modelos que presentaron los valores experimentales de energía más bajos para la suma de los términos E_{NOE} y E_{RDC} .

Elijiendo las primeras 20 de 100, no solo escogemos un número manejable de estructuras para el *ensemble*, sino que además es de esperar que –dado que el número de violaciones por estructura es muy bajo– arribemos a una selección igualmente compatible con el criterio alternativo mencionado anteriormente (Spronk et al., 2004).

Este conjunto de estructuras se sometió seguidamente a un refinamiento en solvente explícito (*water refinement*) y los 20 modelos resultantes se emplearon para el *ensemble* final de As-p18.

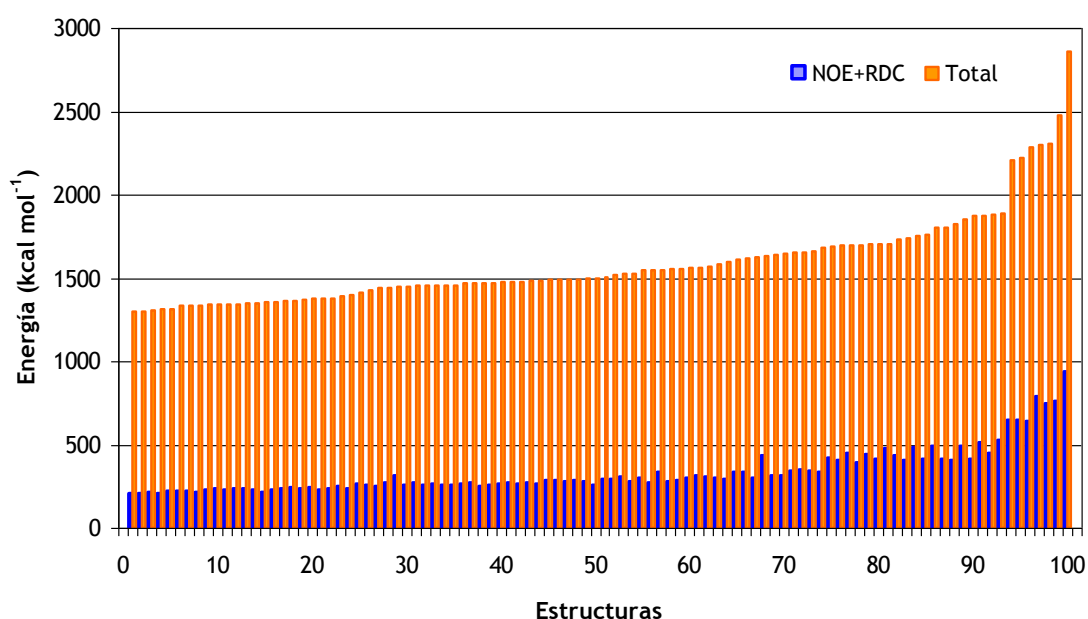


Figura 4.10. Gráfico de las 100 estructuras de As-p18 calculadas en la iteración 8 ordenadas en forma ascendente según la energía total. Contribuciones NOE+RDC (barras azules). Energía total (barras naranjas).

Ajuste del *Ensemble* de As-p18 a las Restricciones Experimentales

La precisión de las estructuras determinadas está directamente relacionada al número de restricciones experimentales empleadas durante el cálculo. De esta manera, cuantas más restricciones se incluyan, mayor será la resolución alcanzada (Nabuurs et al., 2004). Las estadísticas de las restricciones experimentales se resumen en la Tabla 4.7

Restricciones de Distancia NOE	
Restricciones NOE	4529
Ambiguas	1687
No ambiguas	2842
Intra-residuo	1395
Inter-residuo	1447
Secuenciales ($ i-j = 1$)	636
Medio alcance ($1 < i-j < 5$)	225
Largo alcance ($ i-j > 5$)	586
Violaciones por estructura $> 0.5 \text{ \AA}$	0.05
Violaciones por estructura $> 0.3 \text{ \AA}$	2.90
RMSD de Restricciones de Distancia	0.023 \AA
Otras Restricciones	
RDCs	113
Factor Q	0.33
Puentes de Hidrógeno	108
Restricciones de Ángulos Diedros	236

Tabla 4.7. Estadísticas de las Restricciones Experimentales. Datos estadísticos provenientes de los 20 conformeros refinados en agua. El número de violaciones se indica como un promedio por estructura.

A fin de valorar cualitativamente la precisión de la familia de conformeros, se cargaron las 20 estructuras del *ensemble* en el programa *Pymol*. Se examinó visualmente la variación entre modelos y pudo apreciarse que las cadenas principales, con claros elementos de estructura secundaria, eran prácticamente superponibles (Figura 4.11).

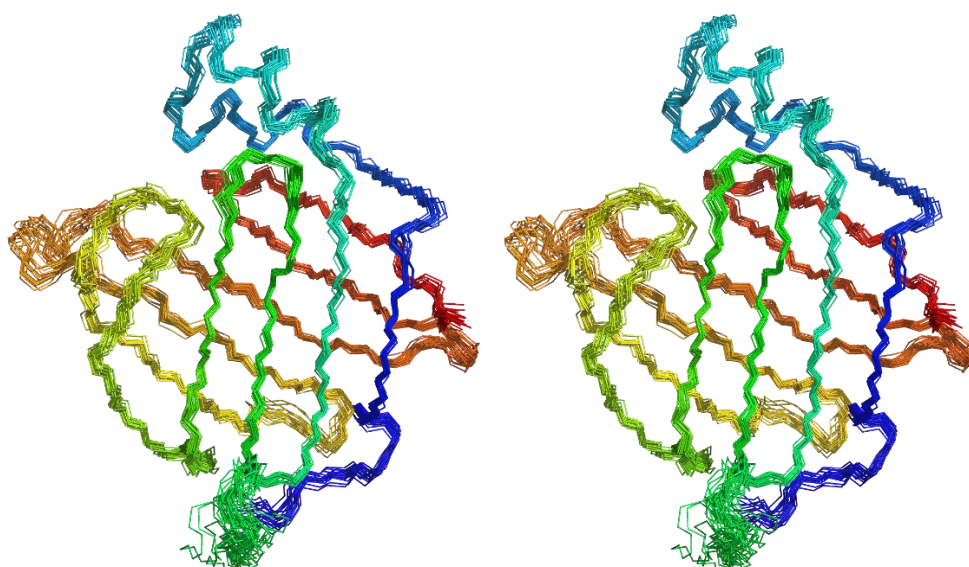


Figura 4.11. Visión estereoscópica de los 20 modelos superpuestos de As-p18. Se muestra el esqueleto aminoacídico coloreado desde el azul (N-terminal) al rojo (C-terminal). Imagen creada con el software *PyMOL™*.

Sin embargo, esto no fue así para las regiones que ocupan los extremos de la secuencia y para las incluidas entre los residuos 48-55, 106-112, que coinciden con los *loops* entre las hebras β -B/ β -C y β -G/ β -H, respectivamente. Para estas regiones, se ve una mayor dispersión en el espacio cartesiano, reflejando la menor cantidad de restricciones en esa área, pudiendo esto último ser atribuido, en algunos casos, a procesos dinámicos (ver Capítulo 5).

Análogamente, para una evaluación cuantitativa de la similitud de las estructuras en el *ensemble*, se calculó la desviación estándar (RMSD) de las coordenadas atómicas de cada estructura en relación a una estructura media no sesgada generada a partir de la familia de conformeros. Se utilizó el programa *UWMN* (*UnWeightedMean*; M. Hartshorn y L. Cuevas, Universidad de York) para crear una matriz de distancias promedio entre los átomos de todos los modelos del *ensemble*. Seguidamente esta

matriz de distancia se proyecta de nuevo en un espacio tridimensional para producir una estructura media no sesgada.

Se calculó el valor de RMSD para los átomos pesados totales y de la cadena principal, y para la totalidad de los C α , tanto para la secuencia de As-p18 madura –sin *tag*–, como para los residuos pertenecientes a segmentos estructurados. Estos últimos se definieron en base a los elementos de estructura secundaria, excluyendo los *loops* y segmentos N- y C-terminales.

	RMSD respecto a la estructura promedio (Å)	
	1-143	Regiones estructuradas
Átomos pesados totales	0.88	0.77
Átomos pesados cadena principal	0.53	0.41
C α	0.55	0.42

Tabla 4.8. RMSD calculado con el software UWMN para la proteína completa sin *tag* y para las regiones estructuradas. Residuos seleccionados como parte de regiones estructuradas: 5-7; 10-17; 19-26; 31-38; 42-47; 56-61; 66-72; 75-82; 85-96; 99-105; 113-121; 124-131; y 134-141.

El análisis de restricciones y RMSD por residuo, revela una correlación lógica donde las regiones estructuradas definidas del conjunto se caracterizan por un elevado número de restricciones NOE, mientras que los *loops* (en especial el *loop* entre los residuos 48 y 55) y los segmentos N- y C-terminales tienen escasos NOEs (Figura 4.12), que consisten principalmente en restricciones de corto alcance, secuenciales.

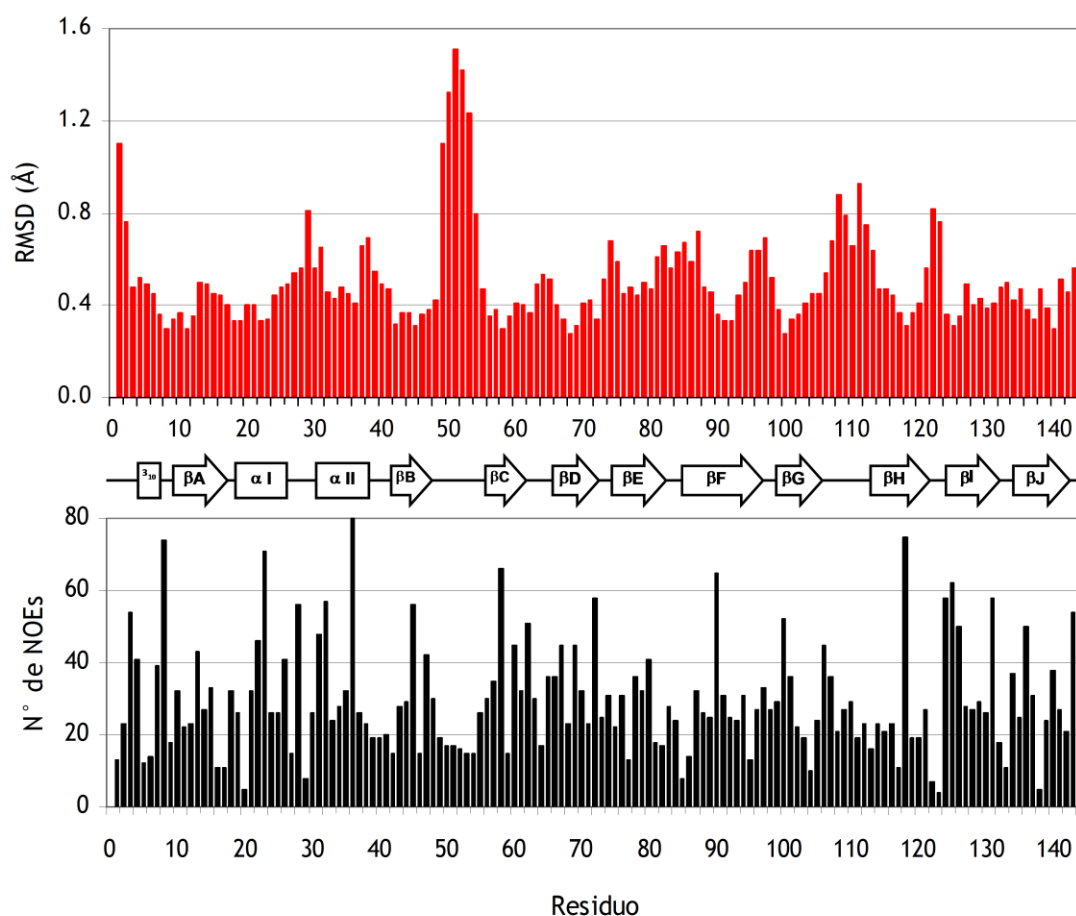


Figura 4.12. Relación entre restricciones de distancia NOE y RMSD en la estructura de As-p18. Se muestra el número de restricciones NOE no ambiguas empleadas en el cálculo final *in vacuo* y los valores de RMSD correspondientes por residuo para las 20 estructuras del *ensemble*. Entre los dos gráficos se representan los elementos de estructura secundaria a lo largo de la secuencia aminoacídica.

Calidad Geométrica del *Ensemble* de As-p18

Para evaluar la calidad geométrica de las estructuras, se calcularon las desviaciones de distintos parámetros, derivados de los modelos experimentales, con respecto a valores idealizados sobre una base empírica general. Como se muestra en la Tabla 4.9, tanto para las distancias y ángulos de enlace, como para los ángulos impropios, pudo comprobarse que las restricciones experimentales se ajustaron a los valores empíricos.

RMSD con respecto a geometría ideal	
Longitud de enlace (Å)	0.01 ± 0.00
Ángulo de enlace (°)	0.57 ± 0.02
Ángulo impropio (°)	1.67 ± 0.06

Tabla 4.9. Resumen de las desviaciones del *ensemble* de As-p18 respecto a valores ideales empíricos.

La calidad geométrica también puede evaluarse acorde a la distribución de los ángulos de torsión de la cadena principal y lateral de cada residuo en la proteína (Morris et al., 1992). Para el caso de As-p18, esta información se recabó empleando el programa *PROCHECK-NMR* (Laskowski et al., 1996) y se muestra en el Apéndice E. Las estadísticas de Ramachandran para la totalidad de los residuos (excluyendo a glicinas y prolinas) se muestran en la Tabla 4.10.

Grupos de residuos	N° de residuos	%
Residuos en zonas más favorables	2122	82.2
Residuos en zonas permitidas	420	16.3
Residuos en zonas generosamente permitidas	20	0.8
Residuos en zonas prohibidas	18	0.7

Tabla 4.10. Resumen de las estadísticas de Ramachandran para el *ensemble* de As-p18 determinadas por *PROCHECK-NMR*.

Más del 98 % de los residuos se encontraron en las zonas favorables o permitidas corroborando así la alta calidad de las estructuras, poseedoras de una correcta geometría covalente. Analizando exhaustivamente los gráficos de Ramachandran para cada residuo (Apéndice E), pudo comprobarse que aquellos que integraban segmentos de estructura secundaria, se situaban dentro o muy próximos a las zonas favorables. Por otro lado, algunos residuos ubicados en el extremo C-terminal o en *loops* (como 49Ala, 54Asp, 65Lys y 85Ser), mostraron una mayor variabilidad en los ángulos ϕ y ψ , probablemente debido a la escasez de restricciones que definieran esas regiones.

Finalmente, se analizaron los valores de χ_1 para evaluar la calidad geométrica de los ángulos de torsión de cadenas laterales. Los resultados generados por *PORCHECK-NMR* (Apéndice E) mostraron valores de χ_1 bien definidos para la mayoría de los residuos, en los 20 modelos de As-p18. Por último, no se encontraron residuos con

valores de χ_1 que cayeran por fuera de las regiones favorables.

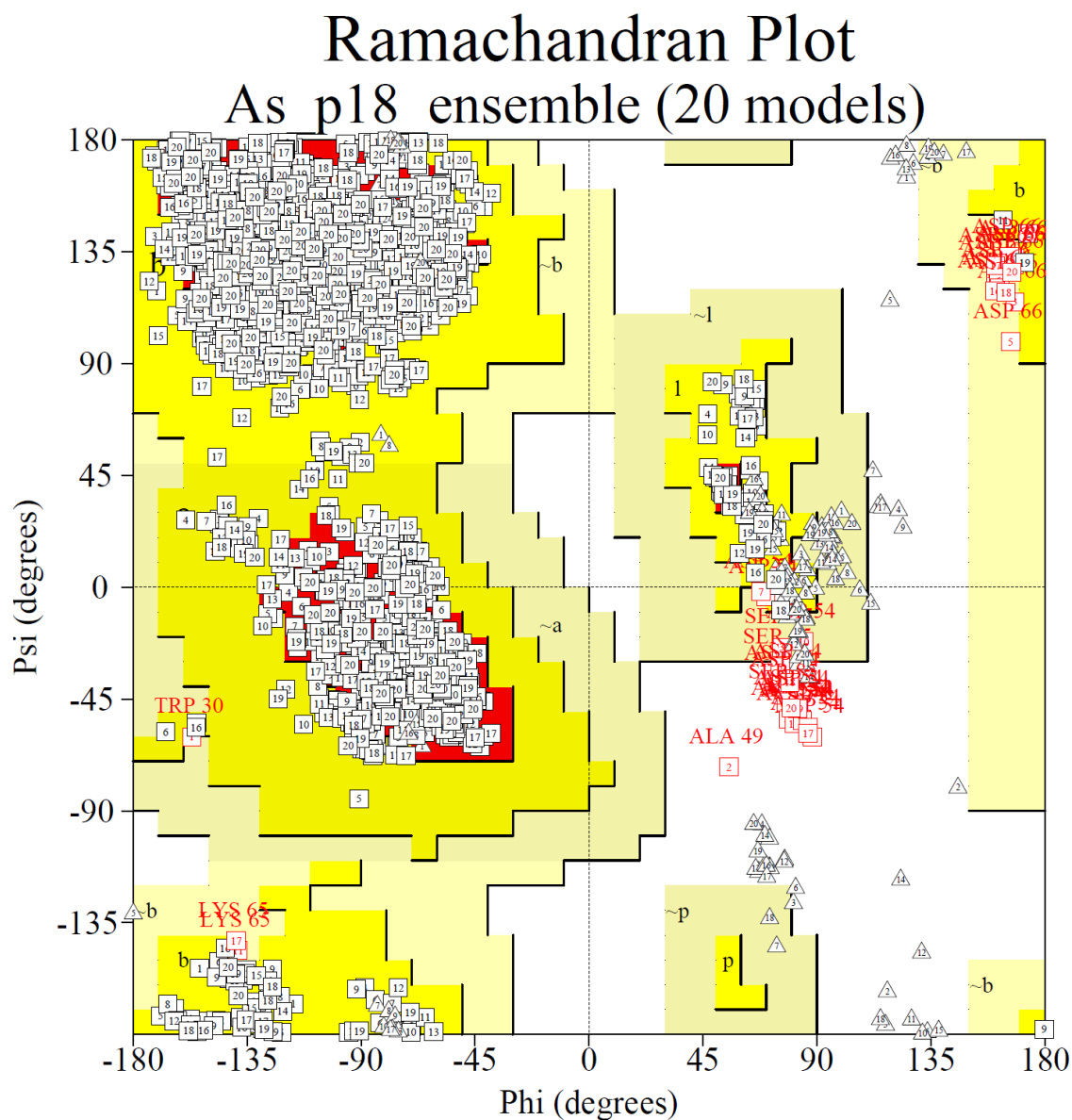


Figura 4.13. Representación de Ramachandran de la estructura de As-p18 (ensemble de 20 modelos). Código de colores: rojo, zona más favorable; amarillo, zona permitida; amarillo claro, zona generosamente permitida; blanco, zona prohibida. Con triángulos se representan los residuos de glicina, y con cuadrados el resto de residuos (blancos, en zonas favorables; rojos, en zonas desfavorables). Diagrama generado por *PROCHECK-NMR*.

4.11 Conclusiones

El muestreo reducido no-uniforme aplicado en los experimentos 3D heteronucleares HNCO, HN(CA)CO, HNCACB y CBCA(CO)NH, redujo el tiempo de adquisición y mostró aumentar significativamente la resolución de los picos, a la vez que se disminuyó notoriamente el tamaño de los artefactos.

Mediante el conjunto de experimentos adquiridos se logró una asignación muy completa de los núcleos del sistema As-p18–ácido oleico. Esto, a su vez, permitió establecer un gran número de restricciones experimentales.

Durante el refinamiento de la estructura, la inclusión de las restricciones de puente de hidrógeno y de RDC tuvo un impacto apreciable en la dispersión del *ensemble*. Así, la incorporación de estos dos sets de restricciones experimentales significó una mejora en la calidad del conjunto de estructuras, con un decremento del valor de RMSD de 0.941 Å a 0.707 Å para las regiones definidas (Ver imagen Apéndice G).

El conjunto de estrategias operativas, incluyendo los experimentos de filtro isotópico y los esquemas de marcación, permitieron determinar de manera precisa la posición del ligando dentro de la proteína. Este enfoque resulta novedoso y no convencional para la determinación por RMN de estructuras de proteínas FABPs en su forma holo. En los casos hasta el momento reportados se recurre al *docking* del ligando sobre una estructura previamente resuelta de la proteína, o al uso de coordenadas cristalográficas en conjunto con restricciones experimentales por RMN (Lücke et al., 2006; Cai et al., 2012; Lassen et al., 1995; He et al., 2007; Eliseo et al., 2007; Tomaselli et al., 2012). El cálculo simultáneo de las dos moléculas solo se ha mencionado en la aplicación de un algoritmo de geometría de distancia por el grupo de Cistola en el año 1996 (Hodsdon et al., 1996).

Los parámetros recabados durante la validación permitieron corroborar la confiabilidad de los datos experimentales y la alta calidad del conjunto de estructuras derivado de esta información.

4.12 Bibliografía

- Breeze AL. (2000) Isotope-filtered NMR methods for the study of biomolecular structure and interactions. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 36(4): 323-372
- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 5):905-21.
- Brutscher B, Schanda P. (2009) Rapid multidimensional NMR: fast-pulsing techniques and their applications to proteins. *Encyclopedia of Magnetic Resonance* 43: 1-10.
- Cai J, Lücke C, Chen Z, Qiao Y, Klimtchuk E, Hamilton JA. (2012) Solution structure and backbone dynamics of human liver fatty acid binding protein: fatty acid binding revisited. *Biophys J* 102(11):2585-94.
- Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer III AG, Skelton NJ. (1996) *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*, Academic Press, New York.
- Chen J, Nietlispach D, Shaka AJ, Mandelshtam VA. (2004) Ultra-high resolution 3D NMR spectra from limited-size data sets. *J Magn Reson* 169(2):215-24.
- Chen K, Tjandra N. (2012) The use of residual dipolar coupling in studying proteins by NMR. *Top Curr Chem* 326:47-67.
- Cheung MS, Maguire ML, Stevens TJ, Broadhurst RW. (2010) DANGLE: a Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J Magn Reson* 202(2):223-233.
- Cierpicki T, Bushweller JH. (2004) Charged gels as orienting media for measurement of residual dipolar couplings in soluble and integral membrane proteins. *J Am Chem Soc* 126(49):16259-66.
- Clubb RT, Thanabal V, Wagner G. (1992) A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue $^1\text{H}^N$, ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C labeled proteins. *J Magn Reson* 1992(97): 213-217.
- Eliseo T, Ragona L, Catalano M, Assfalg M, Paci M, Zetta L, Molinari H, Cicero DO. (2007) Structural and dynamic determinants of ligand binding in the ternary complex of chicken liver bile acid binding protein with two bile salts revealed by NMR. *Biochemistry* 46(44):12557-67.
- Gronenborn AM. (2002) The importance of being ordered: improving NMR structures using residual dipolar couplings. *C R Biol* 325(9):957-66.
- Grzesiek S, Bax A. (1993) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Biomol NMR* 3: 185-204.
- Habeck M, Rieping W, Linge JP, Nilges M. (2004) NOE assignment with ARIA 2.0 protein NMR techniques. Humana Press. pp. 379-402. Humana Press. pp. 379-402.
- Hansen MR, Mueller L, Pardi A. (1998) Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions. *Nat Struct Mol Biol* 5: 1065-1074.
- He Y, Yang X, Wang H, Estephan R, Francis F, Kodukula S, Storch J, Stark RE. (2007). Solution-state molecular structure of apo and oleate-liganded liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry* 46(44):12543-56.
- Hodsdon ME, Ponder JW, Cistola DP. (1996) The NMR solution structure of intestinal fatty acid-binding protein complexed with palmitate: application of a novel distance geometry algorithm. *J Mol Biol* 264(3):585-602.
- Hoch JC, Stern AS. (2001) Maximum entropy reconstruction, spectrum analysis and deconvolution in multidimensional nuclear magnetic resonance. *Methods Enzymol* 338:159-78.
- Hoch JC, Maciejewski MW, Mobli M, Scuyler AD, Stern AS. (2012) nonuniform sampling in multidimensional NMR. *eMagRes* 1: 181-196.
- Hu H, De Angelis AA, Mandelshtam VA, Shaka AJ. (2000) The multidimensional filter diagonalization method. *J Magn Reson* 144(2):357-66.
- Hyberts SG, Arthanari H, Wagner G. (2012) Applications of non-uniform sampling and processing. *Top Curr Chem* 316:125-48.
- Iwahara JJ, Wojciak M, Clubb RT. (2001) Improved NMR spectra of a protein-DNA complex through rational mutagenesis and the application of a sensitivity optimized isotope-filtered NOESY experiment. *J Biomol NMR* 19:231-241.
- Kay LE, Xu GY, Singer AU, Muhandiram DR, Formankay JD. (1993) A gradient enhanced HCCH-TOCSY experiment for recording side-chain ^1H and

^{13}C correlations in H_2O samples of proteins. *J Magn Reson (B)* 101: 333-337

Kazimierczuk K, Koźmiński W, Zhukov I. (2006) Two-dimensional Fourier transform of arbitrarily sampled NMR data sets. *J Magn Reson* 179(2):323-8.

Kirkpatrick S, Gelatt CD Jr, Vecchi MP. (1983) Optimization by simulated annealing. *Science* 220(4598):671-80.

Laskowski RA, Rullmann JAC, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8: 477-486.

Lassen D, Lücke C, Kveder M, Mesgarzadeh A, Schmidt JM, Specht B, Lezius A, Spener F, Rüterjans H. (1995) Three-dimensional structure of bovine heart fatty-acid-binding protein with bound palmitic acid, determined by multidimensional NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 230(1):266-80.

Linge JP, Nilges M (1999) Influence of non-bonded parameters on the quality of NMR structures: A new force field for NMR structure calculation. *J Biomol NMR* 13:51-59.

Linge JP, Williams MA, Spronk CA, Bonvin AM, Nilges M. (2003) Refinement of protein structures in explicit solvent. *Proteins* 20, 496–506.

Lipsitz RS, Tjandra N. (2004) Residual dipolar couplings in NMR structure analysis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 33:387-413.

Luan T, Jaravine V, Yee A, Arrowsmith CH, Orekhov VY. (2005) Optimization of resolution and sensitivity of 4D NOESY using multi-dimensional decomposition. *J Biomol NMR* 33(1):1-14.

Lücke C, Qiao Y, van Moerkerk HT, Veerkamp JH, Hamilton JA. (2006). Fatty-acid-binding protein from the flight muscle of *Locusta migratoria*: evolutionary variations in fatty acid binding. *Biochemistry* 45(20):6296-305.

Marion D. (2005) Fast acquisition of NMR spectra using Fourier transform of non-equispaced data. *J Biomol NMR* 32(2):141-50.

Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM. (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12(4):345-64.

Moseley HN, Sahota G, Montelione GT. (2004) Assignment validation software suite for the evaluation and presentation of protein resonance assignment data. *J Biomol NMR* 28(4):341-55.

Nabuurs SB, Spronk CAEM, Vriend G, Vuister GW. (2004) Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation. *Concepts Magn Reson Part A* 22A: 90-105.

Nilges M. (1995) Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol* 245: 645-660.

Ogura K, Terasawa H, Inagaki F. (1996) An improved double-tuned and isotope-filtered pulse scheme based on a pulsed field gradient and a wide-band inversion shaped pulse. *J Biomol NMR* 8:492-498.

Orekhov VY, Ibraghimov I, Billeter M. (2003) Optimizing resolution in multidimensional NMR by three-way decomposition. *J Biomol NMR* 27(2):165-73.

Ottiger M, Delaglio F, Bax A. (1998) Measurement of J and Dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra. *J Magn Reson* 131: 373-378.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

Rieping W, Habeck M, Bardiaux B, Bernard A, Malliavin TE, Nilges M. (2007) ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* 23 381-382.

Rovnyak D, Filip C, Itin B, Stern AS, Wagner G, Griffin RG, Hoch JC. (2003) Multiple-quantum magic-angle spinning spectroscopy using nonlinear sampling. *J Magn Reson* 161(1):43-55.

Rovnyak D, Frueh DP, Sastry M, Sun Z-YJ, Stern AS, Hoch JC, Wagner G. (2004) Accelerated acquisition of high resolution triple-resonance spectra using non-uniform sampling and maximum entropy reconstruction. *J Magn Reson* 170: 15-21.

Sacchettini JC, Gordon JI, Banaszak LJ. (1989) Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the *Escherichia coli*-derived protein with bound palmitate. *J Mol Biol* 208, 327-339

Sibisi S, Skilling J, Brereton RG, Laue ED, Staunton J. (1984) Maximum entropy signal processing in practical NMR spectroscopy. *Nature* 311: 446-447.

Sklenar V, Piotto M, Leppik R, Saudek V. (1993) Gradient-tailored water suppression for ^1H - ^{15}N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J Magn Reson Series A* 102: 241-245.

Spronk C, Nabuurs S, Krieger E, Vriend G, Vuister G. (2004) Validation of protein structures derived by

NMR spectroscopy. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 45: 315-337.

Tycko R, Blanco FJ, Ishii Y. (2000) Alignment of biopolymers in strained gels: A new way to create detectable dipole-dipole couplings in high-resolution biomolecular NMR. *J Am Chem Soc* 122, 9340-9341.

Tjandra N, Omichinski JG, Gronenborn AM, Clore GM, Bax A. (1997). Use of dipolar ^1H - ^{15}N and ^1H - ^{13}C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution. *Nat Struct Biol* 4:732-8.

Tomaselli S, Assfalg M, Pagano K, Cogliati C, Zanzoni S, Molinari H, Ragona L. (2012) A disulfide bridge allows for site-selective binding in liver bile acid binding protein thereby stabilising the orientation of key amino acid side chains. *Chemistry* 18(10):2857-66.

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED. (2005) The CCPN Data Model for NMR

Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. *Proteins* 59: 687-696.

Vuister GW, Bax A. (1992) Resolution Enhancement and Spectral Editing of Uniformly ^{13}C Enriched Proteins by Homonuclear Broadband ^{13}C Decoupling. *J Magn Reson* 98: 428-435.

Wishart DS, Sykes BD. (1994) The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171-180.

Wittekind M, Mueller L. (1993) HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha- and beta-carbon resonances in proteins. *J Magn Res Series B* 101: 201-205.

Yamazaki T, Forman-Kay JD, Kay LE. (1993) Two-dimensional NMR experiments for correlating carbon-13.beta. and proton.delta./epsilon. chemical shifts of aromatic residues in ^{13}C -labeled proteins via scalar couplings. *J Am Chem Soc* 115: 11054-11055.

5. Estudios de Dinámica de As-p18

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

5. Estudios de Dinámica de As-p18

5.1 Introducción

La idea subyacente en los estudios de dinámica por RMN es que los movimientos globales e internos en las proteínas y la relajación que experimentan los núcleos, se encuentran en íntima correlación. Como se detalla en el Capítulo 2, esto se debe a que tanto los movimientos aleatorios de las moléculas completas, como aquellos movimientos locales que experimentan ciertos residuos, provocan fluctuaciones en el campo magnético que siente un núcleo en particular, afectando la manera en que retorna al equilibrio. En consecuencia, a través del estudio de los parámetros que caracterizan a los procesos de relajación, se puede inferir el comportamiento dinámico general y residuo a residuo en una proteína.

Para estudiar las propiedades dinámicas de As-p18 en su forma holo, se recurrió a la información brindada por los grupos amida de la cadena principal previamente asignados. De esta manera, se determinaron las constantes de tiempo de relajación longitudinal y transversal, T_1 y T_2 y los NOEs heteronucleares. Mediante el protocolo *Model-Free* de Lipari y Szabo se modelaron los movimientos internos, en diferentes escalas de tiempo para los vectores NH. Asimismo, se estudió la accesibilidad al disolvente de los grupos NH peptídicos del esqueleto de As-p18 a través de los experimentos de intercambio con D_2O , mencionados en el Capítulo 4 para la generación de restricciones de puente de hidrógeno.

5.2 Medida de T_1 , T_2 y NOE heteronuclear

Experimentos

Los espectros T_1 y T_2 se basaron en un ^{15}N HSQC, adquirido como un pseudo 3D ^{15}N HSQC, con puntos de tiempo seleccionados en la tercera dimensión (Kay et al., 1989; Farrow et al., 1994; Farrow et al., 1995). Ambos experimentos utilizan una secuencia INEPT reenfozada para lograr una magnetización en fase a lo largo del eje x en el núcleo amida ^{15}N , transferida desde el espín 1H (Hore et al., 2000). En el experimento de relajación T_1 se aplica un pulso de 90° adicional para llevar la magnetización a lo largo del eje z antes del período de relajación del núcleo de nitrógeno. En el experimento de relajación T_2 , la relajación modula la coherencia en ^{15}N , almacenada en el plano transversal, mediante la incorporación de un tren de pulsos CPMG (Carr &

Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958). Para As-p18 se cuantificaron de forma confiable las alturas de 126 picos HN, de un total de 135 picos HN de cadena principal asignados. Para la determinación de T_1 , los tiempos de relajación empleados fueron 101.1, 601.1, 801.1 1201.1, 1801.1 ms con un espectro duplicado en 101.1 ms para la estimación del error. Para el experimento de relajación T_2 , los *delays* se fijaron en 16.96, 33.92, 67.84, 101.76 y 152.74 ms, con duplicados a los 33.92 y 101.76 ms. Aquellas señales que se encontraron extensamente solapadas se omitieron en el análisis de relajación. Los valores NOE ^1H - ^{15}N en estado estacionario se obtuvieron mediante espectros ^{15}N HSQC (comenzando con la magnetización en el ^{15}N), con dos secuencias de pulsos diferentes aunque muy similares: una, el NOE propiamente dicho (NOE_{sat}); y otra, el experimento de referencia (NOE_{ref}). La diferencia entre uno y otro, es que en la secuencia NOE_{sat} se comienza saturando al protón con un tren de pulsos. En la secuencia de referencia no existe este tren de pulsos y en su lugar, simplemente hay un tiempo de espera con una duración equivalente. Como resultado, al final de las dos secuencias se obtendrá, por un lado, un HSQC en el que la intensidad de la señal observada será dependiente de la saturación que se ha aplicado y, por otro, un HSQC equivalente sin haber perturbado los protones amida. El cociente entre las intensidades obtenidas mediante ambas secuencias permitió realizar una estimación de la contribución NOE a la relajación. Ambos experimentos se realizaron por duplicado para obtener el error de la medida.

Procesamiento y Análisis de Datos

Los espectros se procesaron empleando el paquete de programas de *Azara*. Las secuencias de comandos de procesamiento iniciales se crearon a partir de los archivos de datos de Bruker mediante el programa *ReferenceB*. El procesamiento incluyó la apodización de las FIDs por las funciones ventana gaussiana y campana seno (para las dimensiones de ^1H y ^{15}N , respectivamente) y la extensión de puntos mediante la adición de ceros (*zero filling*). Finalmente, se realizó la transformada de Fourier y la posterior corrección de fase. Los espectros procesados se cargaron en el programa *CCPNMR Analysis* (Vranken et al., 2005). Los datos de T_1 y T_2 se incluyeron como series experimentales con sus respectivos tiempos de relajación. Se transfirió la asignación de cada amida de la cadena polipeptídica desde espectros ^{15}N -HSQC para aquellos picos de resolución aceptable que derivaran en datos confiables. Para los experimentos T_1 y T_2 , el tiempo de relajación y error asociados se calcularon aplicando una función de ajuste exponencial a la intensidad de cada pico ($I = A \cdot e^{-Bt}$), graficando la altura (I) en función

del tiempo de relajación (t). Esto se llevó a cabo mediante la herramienta “*follow intensity changes*” dentro del programa *CCPNMR Analysis* (Vranken et al., 2005). El error del ajuste se calculó usando el método de covarianza (Press et al., 1992). La altura de los picos de los espectros NOE_{sat} y NOE_{ref} se exportó desde *CCPNMR Analysis* y se obtuvo una estimación del error a partir de la relación señal-ruido de los experimentos duplicados, empleando el *script* `snratio_nmr` (A. G. Palmer III, www.palmer.hs.columbia.edu/software.html). Las alturas de los picos y los errores asociados se usaron para calcular los NOE_{het} empleando el *script* `noecalc_nmr` (A. G. Palmer III, www.palmer.hs.columbia.edu/software.html).

Resultados

Los valores calculados de T_1 , T_2 y NOE se grafican en función de la secuencia aminoacídica en la Figura 5.1.

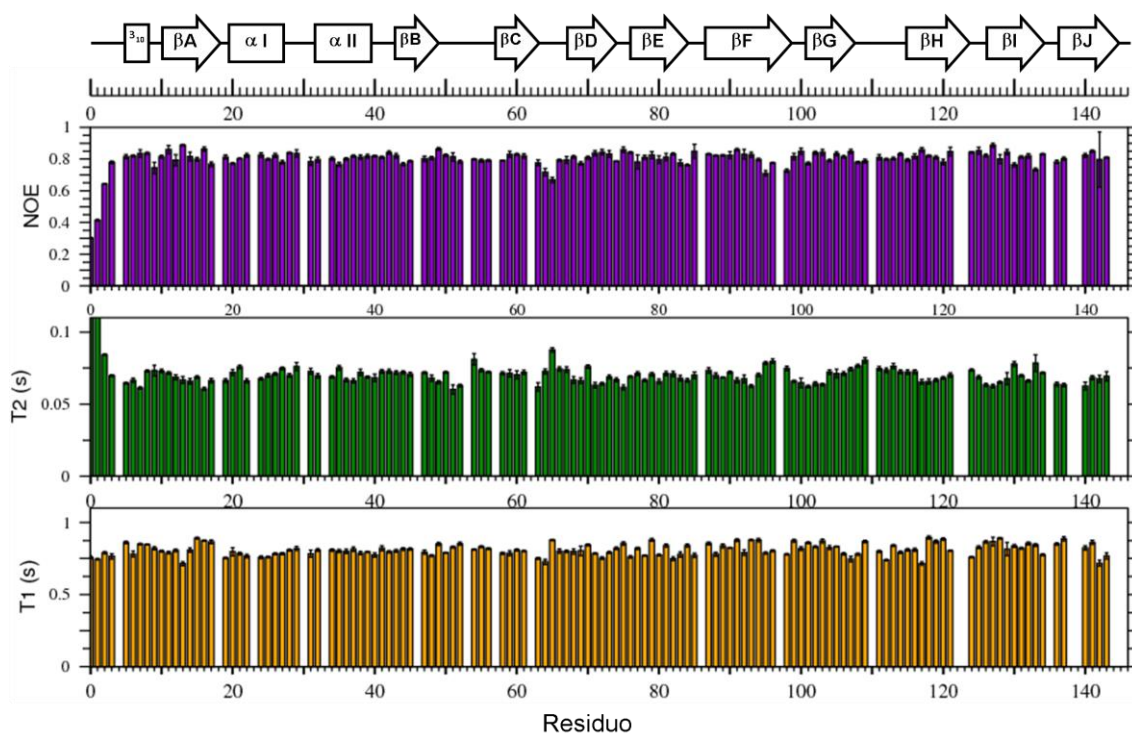


Figura 5.1. Valores de ^{15}N T_1 , T_2 y NOE heteronuclear para cada par N-H de la cadena principal de As-p18 a 60.8 MHz y 298 K.

A excepción del extremo N-terminal que presenta valores apreciablemente altos de T_2 con NOEs notablemente disminuidos, congruente con la flexibilidad que suelen presentar estas regiones en las proteínas, no se evidenciaron grandes desviaciones en los

valores de T_1 , T_2 y NOE. El perfil general de aspecto aplanado para los tres parámetros de relajación determinados, indica que As-p18, en su forma holo, presenta una estructura bastante rígida a lo largo de toda la secuencia aminoacídica. Considerando los valores promedio de cada parámetro, se encontraron algunas desviaciones moderadas que se asocian a procesos dinámicos. Se observaron ligeras depresiones para los valores de NOE en las regiones correspondientes a los *loops* $\beta C-\beta D$ y $\beta F-\beta G$ acompañados por valores anómalos de T_2 , indicativos de movilidad local en la escala de tiempo de los pico a los nanosegundos. Sin embargo, no se trata un panorama absolutamente claro ya que si bien la mayoría presentan T_2 largos, algunos tienen T_2 acortados. El bucle $\beta B-\beta C$ parecería ser moderadamente flexible en el escala de tiempo de los milisegundos ya que presentó valores de NOE y T_1 aplanados, acompañados de T_2 acortados.

5.3 Estimación del Tiempo de Correlación Global y Tensor de Difusión Rotacional

El tipo de movimiento que describe una molécula puede ser isotrópico o anisotrópico dependiendo de su morfología global. Definir el tipo de modelo previo a la extracción de información sobre la dinámica interna, es importante para no arribar a conclusiones inexactas (v.g. una subestimación en la anisotropía en la rotación global puede llevar a una sobreestimación de los términos de intercambio químico, R_{ex}). El gráfico de T_1 en función de T_2 para cada aminoácido (Figura 5.2) permitió una aproximación preliminar del tiempo de correlación rotacional de toda la molécula y derivar el modelo de tensor rotacional para As-p18 como isotrópico.

Para la gran mayoría de los residuos se vio que los tiempo de correlación caían en un rango estrecho entre los 10.5 y los 11.5 ns, indicando así que As-p18 no presenta un carácter anisotrópico marcado en la difusión rotacional. La mayor parte de los puntos en el gráfico se agrupan cercanos a la curva de $S^2 = 1$, evidenciando que la estructura 3D de As-p18 es bastante rígida. Por el contrario, no se observaron puntos a la derecha de la curva $S^2 = 0.8$, a excepción del residuo 1, que al estar situado en el N-terminal de la proteína, justifica su ubicación en el gráfico en zonas que implican gran flexibilidad. Desde el punto de vista teórico, no se deberían observar residuos con un S^2 mayor a 1. Los puntos que cayeron hacia la izquierda de esa curva o muy próximos a ella, podrían explicarse por la presencia de cambios conformacionales lentos o intercambio químico R_{ex} que disminuyen los valores de T_2 , y en consecuencia, desplazan los puntos hacia ese

sector del gráfico. Muchos de estos puntos corresponden a “residuos bisagra” en el comienzo o final de los *loops*, para los cuales el intercambio químico suele presentarse de manera evidente: sus movimientos se hallan más restringidos que los de los propios *loops*, por lo que pueblan un menor número de conformaciones discretas, alternando entre ellas más lentamente.

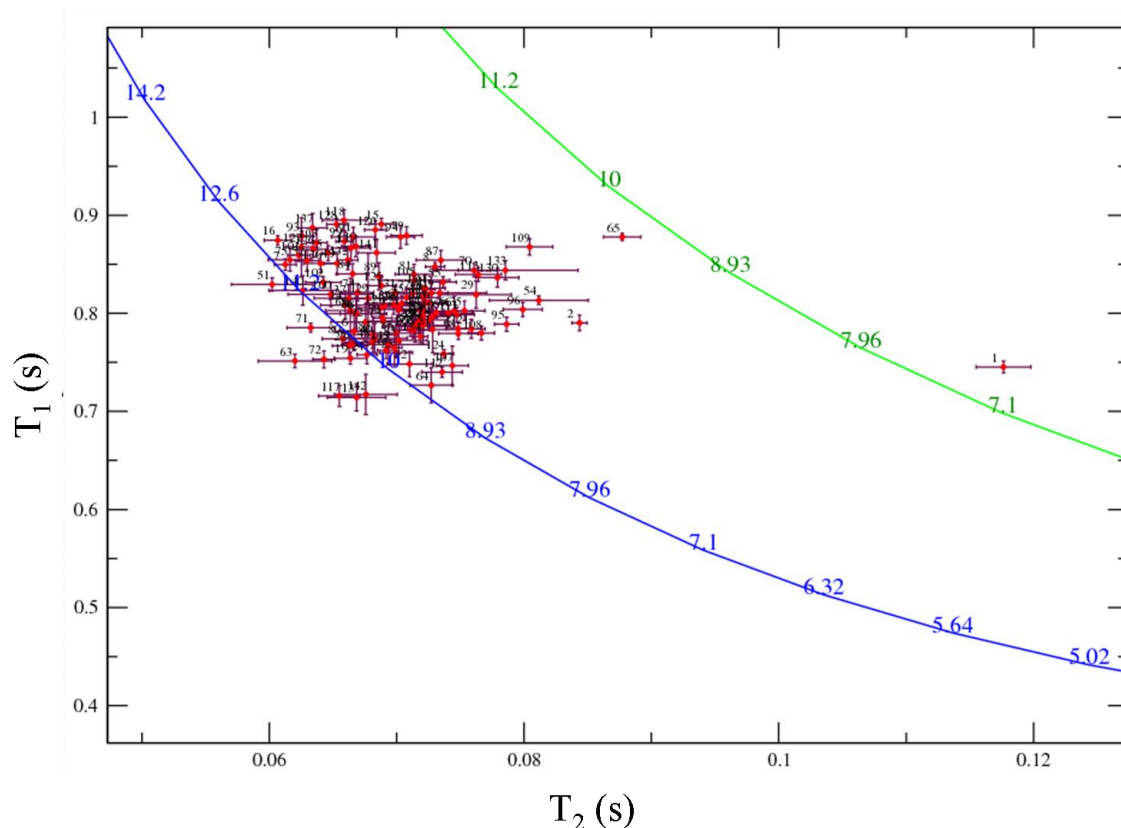


Figura 5.2. ^{15}N T_1 en función de T_2 para ^{13}C , ^{15}N As-p18 en su forma holo a 298 K y 60.8 MHz. Cada punto corresponde a un residuo. Las líneas representan los valores esperados de T_1 y T_2 para los tiempos de correlación trazados a lo largo de las curvas. Estos valores se obtienen por simulación empleando el modelo de Lipari-Szabo, considerando $S^2 = 1.0$ y $S^2 = 0.8$ (curvas azul y verde, respectivamente).

A fin de estimar los valores de τ_c para cada residuo se utilizó el *script* *r2r1_tm* (A. G. Palmer III, www.palmer.hs.columbia.edu/software.html) que se basa en la ecuación de Kay (Kay et al., 1989) para calcular tiempos de correlación a partir de la relación T_1/T_2 (o R_2/R_1). Para asegurar una estimación precisa de τ_c , se excluyeron del cálculo todos los residuos con valores de NOE < 0.6 o con un valor de T_1/T_2 que se apartara de la media en más de una desviación estándar. Los valores de τ_c para los residuos restantes se muestran en la Figura 5.3. A partir de estos resultados obtenidos se estimó el τ_m para la molécula entera de As-p18 en 10.4 ± 0.3 ns.

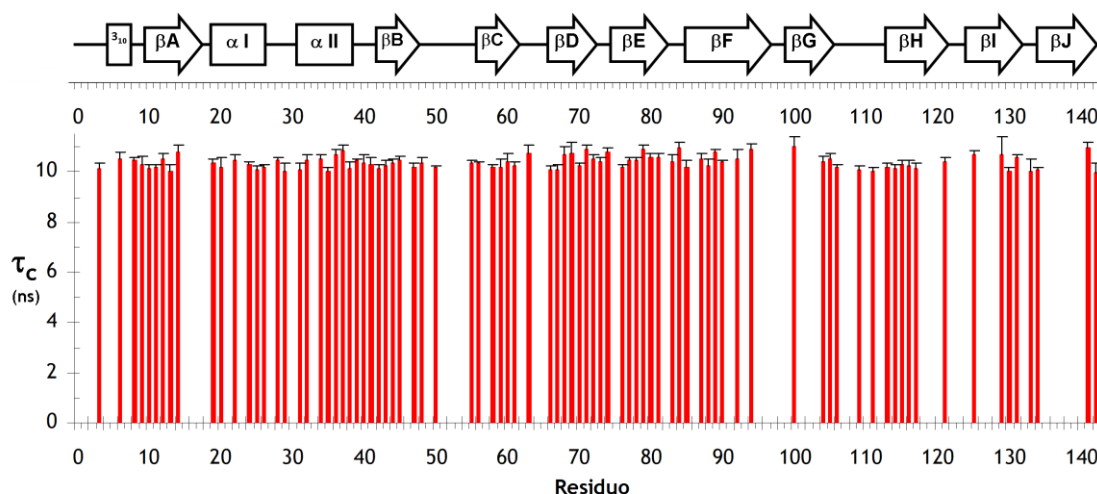


Figura 5.3. Tiempos de Correlación Rotacional, τ_c , estimados partir de R_1 y R_2 .

Como regla general, el τ_m de una proteína monomérica en solución a 25 °C, en ns, es de aproximadamente 0.6 veces su peso molecular en kDa (Rossi et al., 2010). Considerando que el peso molecular de As-p18, excluyendo al *tag* flexible y corrigiendo por las especies isotópicas empleadas (Brendan Duggan <http://sopnmr.ucsd.edu/biomol-tools.htm>), es de 17.86 kDa, el τ_m estimado a partir de los datos de dinámica está dentro de los valores esperados para una proteína isotrópica de ese tamaño.

Otro hecho que respalda la elección del modelo de difusión rotacional isotrópico se encuentra en los estudios de dinámica reportados en la literatura para otras FABPs. Si bien se describe que las FABPs pueden presentar una ligera asimetría, se ha demostrado que el uso de un tensor isotrópico no reporta diferencias significativas respecto de uno axialmente simétrico (Hodson & Cistola, 1997^b; Constantine et al., 1998; Lücke et al., 1999; Franzoni et al., 2002; Gutiérrez-González et al., 2002; Ragona et al., 2006; Cai et al., 2012).

5.4 Análisis *Model Free*

A partir de los parámetros de relajación T_1 , T_2 y NOE ^1H - ^{15}N se analizaron los movimientos internos rápidos de As-p18 mediante el programa *FASTModelFree* (Cole & Loria, 2003). Este software interactúa a su vez con el programa *ModelFree* (Mandel et al., 1995; Palmer et al., 1991) que ajusta cada par N-H a uno de los cinco modelos descritos por Lipari y Szabo (Lipari & Szabo, 1982^{a/b}). Como se comenta en

Modelo	#	Residuos
1 (S^2)	59	6, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 22, 24, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 47, 48, 50, 59, 60, 61, 63, 67, 68, 70, 72, 73, 76, 77, 78, 80, 81, 82, 83, 85, 87, 88, 90, 92, 100, 105, 106, 107, 111, 114, 115, 116, 121, 129, 131, 134, 142
2 (S^2 , τ_e)	13	20, 35, 44, 45, 55, 58, 64, 66, 104, 109, 113, 130, 133
3 (S^2 , R_{ex})	19	5, 7, 14, 37, 51, 71, 79, 89, 93, 99, 102, 103, 118, 119, 125, 126, 128, 132, 140
4 (S^2 , τ_e , R_{ex})	6	17, 74, 84, 101, 120, 136
5 (S^2 , τ_e , S_f^2)	6	1, 2, 21, 65, 96, 98
No ajustado	23	3, 13, 15, 16, 25, 27, 49, 52, 54, 56, 69, 75, 91, 94, 95, 108, 112, 117, 124, 127, 137, 141, 143
No incluido	17	4, 18, 23, 30, 33, 46, 53, 57, 62, 86, 97, 110, 122, 123, 135, 138, 139

Tabla 5.1. Asignación de resonancias amida de As-p18 de acuerdo al *Model Free*. Los 17 residuos no analizados, incluyen a las 4 prolinas de la secuencia aminoacídica, 4 amidas no asignadas y otros 9 residuos excluidos del análisis por no presentar señales amida lo suficientemente resueltas que derivaran en datos confiables.

el Capítulo 2, estos modelos son: Modelo 1 (S^2), 2 (S^2 , τ_e), 3 (S^2 , R_{ex}), 4 (S^2 , τ_e , R_{ex}) y 5 (S^2 , τ_e , S_f^2). El criterio de selección de modelo se basó en el protocolo detallado por Mandel y col. (1995), con modificaciones incluidas por Chen (Chen et al., 2004). Como punto de partida se asignó un tensor de difusión isotrópico con un τ_m inicial aproximado de 10.3 ns permitiendo que el programa los optimizara en el transcurso de la corrida.

En la Tabla 5.1 se resumen los modelos para los 126 residuos asignados, así como aquellos excluidos y no ajustados. En la Figura 5.4 se incluye una visualización de la distribución de modelos a lo largo de la secuencia y su estructura secundaria. Los parámetros optimizados S^2 , τ_e , R_{ex} y S^2_f para cada grupo amida de la cadena principal de As-p18 se enumeran en el Apéndice F junto con la suma de los errores de los cuadrados (*sum of squared errors*, *SSE*).

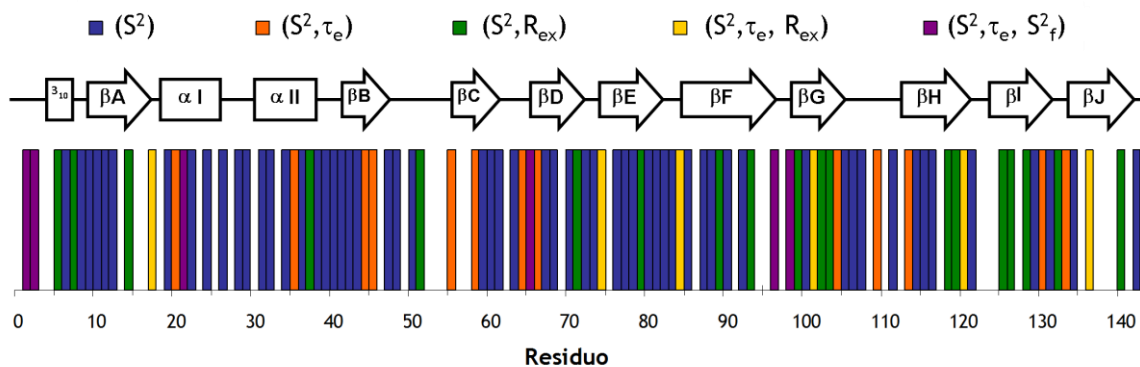


Figura 5.4. Distribución de modelos de movimientos internos a lo largo de la secuencia según el protocolo *Model Free*.

En la Figura 5.5 se muestra la magnitud de varios parámetros del *Model Free* para los residuos ajustados.

Los resultados corroboraron un perfil bastante rígido a lo largo de la secuencia de As-p18. Esto quedó evidenciado por los valores de S^2 por encima de 0.8 para la mayoría de los residuos y un valor promedio de 0.93 lo que implican una movilidad restringida. De los 126 residuos sometidos a análisis por *Model Free*, 59 fueron asignados al modelo 1 (S^2). Para estos pudo asumirse que los N-H presentaban movimientos internos de muy pequeña amplitud, en una escala de tiempo menor a los picosegundos. El modelo 3 (S^2 , R_{ex}), que considera los fenómenos de intercambio que tienen lugar en la escala de los micro- a milisegundos, pareció predominar ligeramente en las hebras β -G β -H β -I y β -J. Así lo indicaron las constantes de canje, R_{ex} determinadas para los residuos 99, 101, 102, 103, 118, 119, 120, 125, 126, 136, 140. Aparentemente existiría cierto grado de intercambio químico en aminoácidos que aparecen esporádicamente a lo largo de la secuencia, destacándose los residuos 5Asp y 7Phe en la hélice 3_{10} ; 51Gly en el *loop* β B- β C y 93Asp ubicada en la hebra β -F. Los movimientos internos rápidos más notables se encontraron circunscriptos a los siguientes residuos: 1Lys y 2Thr, situados en el N-terminal con S^2 0.52 y 0.79 y τ_e 1.15 y 1.04 ns, respectivamente. 21Glu en la hélice α -I

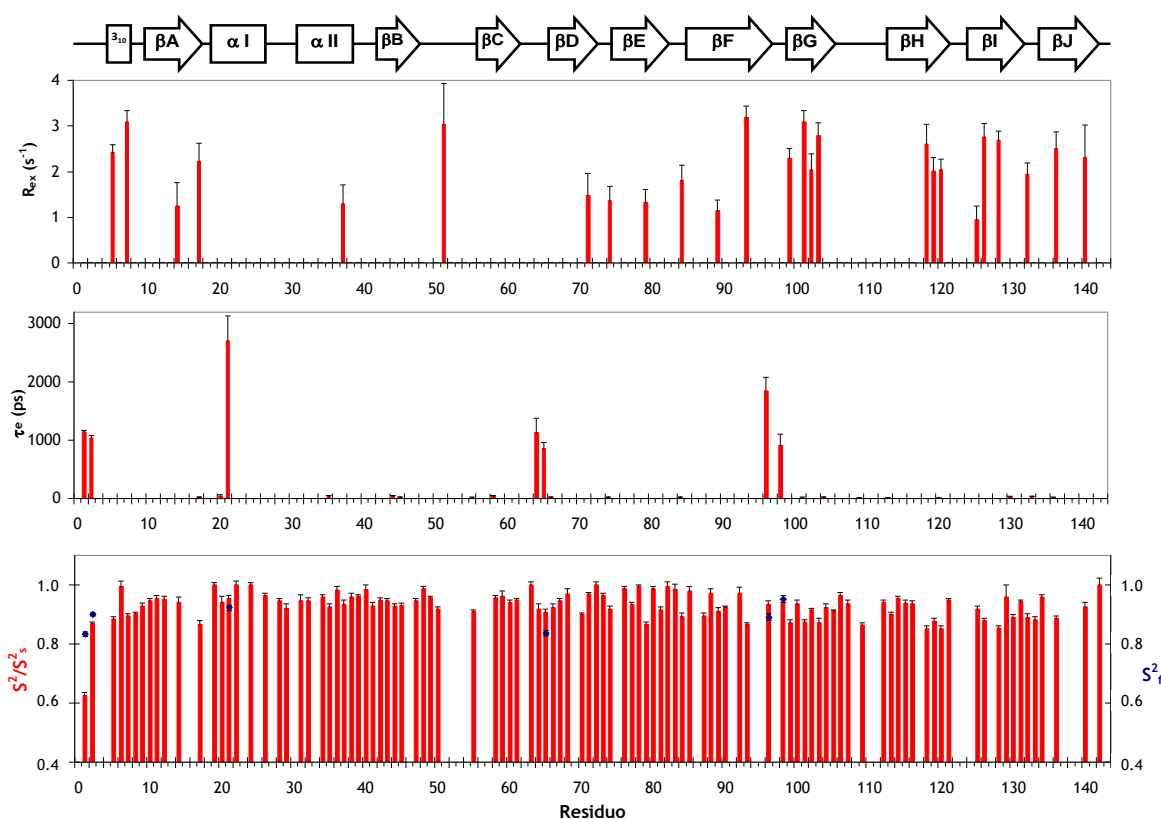


Figura 5.5. Parámetros derivados del análisis *Model Free* graficados en función del número de residuo.

con S^2 0.88 y τ_e 2.71 ns. Las lisinas 64 y 65, ubicadas en el *loop* βC - βD con valores de S^2 de 0.92 y 0.76, y τ_e de 1.13 y 0.86 ms, respectivamente. Y 96Asp y 98Asn en el *loop* βF - βG con parámetros de orden de 0.83 y 0.90 y τ_e de 1.85 y 0.90 ns, respectivamente. Para todos ellos el modelo 5 resultó el más adecuado (excepto el residuo 64 que ajustó mejor al modelo 2). Esto implica que además de considerar movimientos internos en escalas de tiempos rápidas, también deben tenerse en cuenta movimientos relativamente lentos, volviendo más compleja la descripción de los movimientos que experimentan estos residuos (Clare et al., 1990). Para casi la totalidad de los pares N-H analizados que no pudieron ser ajustados, se comprobó que pertenecían a regiones que conectan elementos de estructura secundaria o muy próximas a ellas, a las zonas cercanas al N- y C-terminal y/o a residuos que experimentaban intercambio con el solvente (como se determinó posteriormente, ver sección siguiente). El hecho de que esos pares N-H no encajen en ningún modelo podría atribuirse a eventos dinámicos más complejos o a la escasez de datos. En este sentido cabe mencionar que los datos obtenidos provienen de experimentos empleando una sola intensidad de campo, por lo que el muestreo de la función de densidad espectral queda limitada a algunas frecuencias.

5.5 Accesibilidad del Disolvente

Los ensayos de intercambio H/D, llevados a cabo durante la generación de restricciones, suministraron además información sobre las regiones dinámicas en la estructura de As-p18. Las zonas unidas por puentes de hidrógeno, las cuales se encuentran más restringidas en sus movimientos internos, presentan menor probabilidad de intercambiar hidrógenos con el disolvente. De manera inversa, las regiones con mayor movilidad interna o que experimenten intercambio químico, serán más propensas a canjear rápidamente con el agua hidrógenos por deuterios.

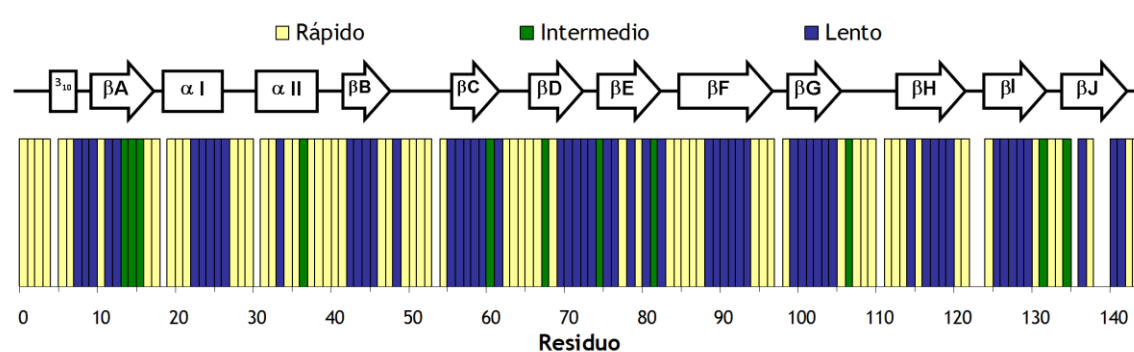


Figura 5.6. Distribución de velocidades de intercambio de hidrógeno a lo largo de la secuencia de As-p18. En amarillo se indican los residuos bajo intercambio rápido (< 30 min), en verde los de velocidad de canje intermedia (30 – 150 min) y en azul los de intercambio lento (> 150 min).

Como se expuso en el Capítulo 4, se realizó un seguimiento de las señales amidas en una serie de experimentos ^{15}N -HSQC adquiridos a intervalos regulares. Se registró la desaparición de aquellos NH que intercambiaron con el D_2O en el que se disuelve la muestra liofilizada de As-p18. Los residuos se clasificaron de acuerdo al siguiente criterio: aquellas señales que desaparecían en los primeros 30 min, como hidrógenos de intercambio rápido. Aquellos que lo hicieron entre los 30 y 150 min, como de intercambio de velocidad intermedia. Finalmente, aquellas señales que persistieron más allá de los 150 min, se clasificaron como de intercambio lento. En la Figura 5.6 se muestran los grupos NH coloreados de acuerdo a esta clasificación y su distribución a lo largo de la secuencia de As-p18 y de su estructura secundaria.

Se pudo comprobar que prácticamente la totalidad de los residuos que presentaban un intercambio lento con el solvente, correspondían a los elementos de estructura secundaria definidos para As-p18. Como era de esperar, las hebras β que conforman el barril, disponiéndose en forma de antiparalela, contenían la mayoría de los hidrógenos

de intercambio lento. Esto resulta lógico debido a que se encuentran comprometidos en los puentes de hidrógeno que establecen entre sí, contribuyendo a la estabilización del plegamiento tridimensional. Por último se observó que la hélice α II, presentaba hidrógenos amida mayoritariamente de intercambio rápido, lo que estaría indicando una mayor exposición al solvente que la que presenta la hélice α I.

5.6 Comparación con apo As-p18

Debido a un problema mixto en una muestra de apo As-p18 destinada a obtener los parámetros de relajación de la proteína en su forma no complejada; se decidió no utilizar los espectros adquiridos. El problema mixto de la muestra se evidenció en los ^{15}N -HSQC que presentaron signos de degradación y deslipidización incompleta. A pesar de esto, sí se contaban con algunos espectros previos, adquiridos a partir de muestras anteriores de apo As-p18. Analizando, asignando y contrastando los ^{15}N -HSQC con los provenientes de holo As-p18, pudo indagarse sobre algunos aspectos de la dinámica de la proteína en su forma libre de ligando de manera comparativa. Para la asignación confiable de las señales NH peptídicas, se recurrió a la asignación secuencial de espectros HNCACB/CBCA(CO)NH y HNCO/HN(CA)CO para una muestra de apo As-p18. Un hecho notable al comparar los dos espectros ^{15}N -HSQC, además de las perturbaciones de corrimiento químico en los residuos afectados directa o indirectamente por la unión de ligando, fue que se evidenció una cantidad apreciable de señales que se ausentan en la forma apo, claramente identificables en la forma holo. Curiosamente como se ve en la Figura 5.7, estas señales amida ausentes en apo As-p18 se concentran en la hélice α II y su periferia, como así también en el *loop* β C- β D. Una inspección cuidadosa permitió además comparar la intensidad de las señales de los dos HSQC, y se encontró que para algunos residuos éstas se presentaban apreciablemente más ensanchadas para la forma apo (tabla con lista de picos ^{15}N -HSQC, ver Apéndice D). Se tomó como criterio la relación de intensidades de los picos, designándose como ensanchados aquellos con $I_{\text{apo}}/I_{\text{holo}} < 0.5$). La desaparición de las señales amidas en apo As-p18 puede atribuirse muy probablemente a que se encuentren bajo un proceso de intercambio químico, ya sean cambios conformacionales o algún fenómeno de intercambio con el solvente. Las señales ensanchadas que se evidenciaron para los residuos lindantes reforzaría esta observación. Asimismo, la región correspondiente al *loops* β E- β F también presentó señales ensanchadas en la forma apo. Teniendo en cuenta

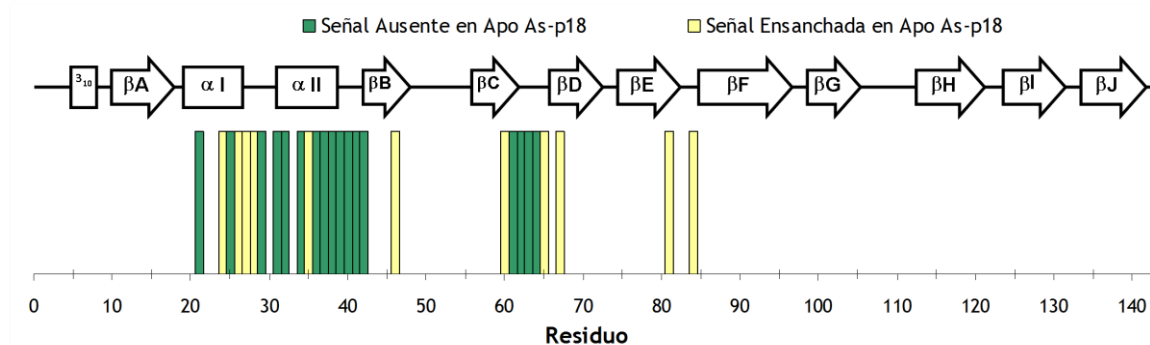


Figura 5.7. Ubicación de las señales amida ausentes y ensanchadas en apo As-p18, respecto de la forma holo. En verde se indican los residuos y su posición relativa en la estructura secundaria para los que no se hallaron las señales NH en los espectros apo, pero sí en los holo. En amarillo, las señales amida peptídicas ensanchadas.

las secciones que conforman la región portal en las FABPs (hélice α II, *loops* β C- β D y β E- β F), podría conjeturarse que en la forma apo de As-p18, esta región presenta cierta dinámica que es estabilizada, al menos en parte, por la unión al ligando. En términos cualitativos el efecto estabilizador de la unión al ligando se reflejaría en la aparición y/o agudización de las señales en el ^{15}N -HSQC.

En relación a otras FABPs, estudios de dinámica indican que el alto grado de flexibilidad del esqueleto peptídico en la región portal sería un factor determinante en el proceso de unión al ligando. En este sentido, la hipótesis del portal dinámico enuncia que los residuos en esta región exhiben movimientos que permiten la apertura o cierre del mencionado portal, permitiendo la entrada del ligando a la cavidad (Hodsdon & Cistola, 1997^{a/b}; Ragona et al., 2006; Cai et al., 2012). Una vez unido el ligando se evidencia un efecto estabilizador en la estructura global de la proteína, reflejado en los parámetros dinámicos y de intercambio H/D que dan cuenta de una estructura más rígida.

5.7 Conclusiones

As-p18 experimenta una difusión rotacional que puede aproximarse satisfactoriamente como isotrópica. El tiempo de correlación estimado a partir de las velocidades de relajación de los grupos amida del esqueleto, fue de 10.4 ns. Este valor resultó acorde al peso molecular de As-p18 considerando el enriquecimiento isotópico y excluyendo la secuencia de polihistidina N-terminal, no estructurada.

Al igual que para otras FABPs, la elección de un tensor isotrópico resultó adecuada para el análisis de dinámica por *Model Free*. Los movimientos internos de una gran proporción de residuos lograron ajustarse a uno de los cinco modelos de Lipari y Szabo. Pudo determinarse un perfil apreciablemente rígido a lo largo de toda la secuencia de As-p18. Por fuera de esta tendencia general, se encontró que los *loops* conectando las hebras β C- β D y β F- β G, presentaban eventos dinámicos en la escala de los pico a nanosegundos. Por su parte el lazo β B- β C experimentaría fenómenos de intercambio químico que ocurren en la escala del milisegundo. Esto concuerda con los valores de RMSD elevados para esta región, comentados en el Capítulo 4; destacando la movilidad por sobre la mera falta de restricciones para explicar la mayor dispersión en esta zona.

Los residuos cuyos movimientos internos no pudieron ser ajustados por *Model Free* se encontraban mayoritariamente en zonas de conexión de hebras β , pudiendo experimentar dinámicas complejas. Su comprensión podría mejorarse mediante la adquisición de datos experimentales adicionales. En este sentido, podrían utilizarse curvas de dispersión de relajación ("*relaxation dispersion*") (Carr & Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958; Palmer et al., 2001) para verificar y caracterizar en profundidad los valores de T_2 acortados, encontrados para los residuos que se encontraban a la izquierda o muy próximos a la gráfica de $S^2=1$.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de intercambio H/D corroboraron la estabilidad característica del arreglo de hoja beta antiparalela, presente en las FABPs.

A partir de comparaciones cualitativas de espectros se prevé que la forma apo de As-p18 presenta una flexibilidad incrementada en la región portal, la cual podría ser de importancia para el evento de unión al ligando. Una vez que esto ocurre, un efecto estabilizador contribuiría a aumentar los parámetros de orden (S^2). Esto se halla reportado para una gran cantidad de FABPs donde la estabilización también se ve reflejada en los experimentos de intercambio H/D: las formas holo de las FABPs presentan un mayor número de H de intercambio lento que las formas apo (Lücke et al., 1996; Gutiérrez-González et al., 2002).

Distintas clases de FABPs presentan diversos patrones de movilidad interna. Posiblemente, existe una correlación entre la estabilidad y flexibilidad de la proteína con la afinidad y especificidad de unión al ligando (Lücke et al., 1996; Gutiérrez-González et al., 2002; Haunerland & Spener, 2004). Para As-p18 el perfil rígido que exhibe se vincularía con una gran estabilidad y una especificidad de ligando pronunciada.

5.8 Bibliografía

Cai J, Lücke C, Chen Z, Qiao Y, Klimtchuk E, Hamilton JA. (2012) Solution structure and backbone dynamics of human liver fatty acid binding protein: fatty acid binding revisited. *Biophys J* 102(11):2585-94.

Carr HY, Purcell EM. (1954) Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical Review* 94: 630.

Chen J, Brooks CL 3rd, Wright PE. (2004) Model-free analysis of protein dynamics: assessment of accuracy and model selection protocols based on molecular dynamics simulation. *J Biomol NMR* 29(3):243-57.

Clore GM, Szabo A, Bax A, Kay LE, Driscoll PC, Gronenborn AM. (1990) Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation of proteins. *J Am Chem Soc* 112: 4989-4991.

Cole R, Loria JP. (2003) FAST-Modelfree: a program for rapid automated analysis of solution NMR spin-relaxation data. *J Biomol NMR* 26(3):203-13.

Constantine KL, Friedrichs MS, Farmer BT. (1998) Backbone and side chain dynamics of uncomplexed human adipocyte and muscle fatty acid-binding proteins. *Biochemistry* 37:7965-7980.

Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, Gish G, Shoelson SE, Pawson T, Forman-Kay JD, Kay LE. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 33(19):5984-6003.

Farrow NA, Zhang O, Forman-Kay JD, Kay LE. (1995) Comparison of the backbone dynamics of a folded and an unfolded SH3 domain existing in equilibrium in aqueous buffer. *Biochemistry* 34: 868-878.

Franzoni L, Lücke C, Rüterjans H. (2002) Structure and backbone dynamics of apo- and holo-cellular retinol-binding protein in solution. *J Biol Chem* 277:21983-21997.

Gutiérrez-González LH, Ludwig C, Lucke C. (2002) Solution structure and backbone dynamics of human epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP). *Biochem J* 364:725-737.

Haunerland NH, Spener F. (2004) Properties and physiological significance of fatty acid-binding proteins. *Adv Mol Cell Biol* 33: 99-122.

Hodsdon ME, Cistola DP. (1997a) Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry* 36(6):1450-60.

Hodsdon ME, Cistola DP. (1997b) Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by ¹⁵N NMR relaxation and ¹H exchange. *Biochemistry* 36(8):2278-90.

Hore PJ, Jones JA, Wimperis S. (2000) NMR: the toolkit. Oxford, New York : Oxford University Press, - Oxford chemistry primers ; 92. 85 pag.

Kay LE, Torchia DA, Bax A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by nitrogen-15 inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28: 8972-8979.

Lipari G, Szabo A. (1982a) Model-free approach to the interpretation of NMR relaxation in macromolecules. I. Theory and range validity. *J Am Chem Soc* 104:4546-4559.

Lipari G, Szabo A. (1982b) Model-free approach to the interpretation of NMR relaxation in

macromolecules. 2. Analysis of experimental results. J Am Chem Soc 104:4559-4570.

Lücke C, Zhang F, Rüterjans H, Hamilton JA, Sacchettini JC. (1996) Flexibility is a likely determinant of binding specificity in the case of ileal lipid binding protein. Structure 4(7):785-800.

Lücke C, Fushman D, Rüterjans H. (1999) A comparative study of the backbone dynamics of two closely related lipid binding proteins: bovine heart fatty acid binding protein and porcine ileal lipid binding protein. Mol Cell Biochem 192:109-121.

Mandel AM, Akke M, Palmer AG 3rd. (1995) Backbone dynamics of *Escherichia coli* ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. J Mol Biol 246(1):144-63.

Meiboom S, Gill D. (1958) Modified spin echo method for measuring nuclear relaxation times. Rev Sci Instrum 29: 688-691.

Palmer AG, Rance M, Wright PE. (1991) Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural abundance carbon-13 heteronuclear NMR spectroscopy. J Am Chem Soc 113 (12), 4371-4380.

Palmer AG, Kroenke CD, Loria JP. (2001) Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. Methods Enzymol 339: 204-238.

Press W, Teukolsky S, Vetterling W, Flannery B. (1992) Numerical Recipes: The Art of scientific Computing. 2 ed: Cambridge University Press.

Ragona L, Catalano M, Luppi M, Cicero D, Eliseo T, Foote J, Fogolari F, Zetta L, Molinari H. (2006) NMR dynamic studies suggest that allosteric activation regulates ligand binding in chicken liver bile acid-binding protein. J Biol Chem 281(14):9697-709.

Rossi P, Swapna GV, Huang YJ, Aramini JM, Anklin C, Conover K, Hamilton K, Xiao R, Acton TB, Ertekin A, Everett JK, Montelione GT. (2010) A microscale protein NMR sample screening pipeline. J Biomol NMR 46(1):11-22.

Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED. (2005) The CCPN Data Model for NMR Spectroscopy: Development of a Software Pipeline. Proteins 59: 687-696.

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

6. Análisis de Estructura de As-p18

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

6. Análisis de Estructura de As-p18

6.1 Introducción

La estructura tridimensional de una proteína viene determinada por su secuencia de aminoácidos y las características físicas de su entorno. A su vez, la función que desempeñe depende estrechamente de su estructura. Por lo tanto, explorar las características y patrones en el plegamiento de As-p18 proporciona información de referencia necesaria para entender qué roles específicos podría llevar a cabo.

En este Capítulo se analizan la topología general de As-p18, como así también se caracteriza la conformación global, la superficie, la cavidad interna, la disposición adoptada por el ligando, y los *loops* alargados expuestos en superficie. Asimismo, para contextualizar la descripción, se comparan ciertos aspectos con los que presentan otras estructuras de la familia de las FABPs. Por último, se destaca la relevancia que podría tener la estructura de As-p18 para inferir el plegamiento de otras nemFABPs.

6.2 Descripción General

Topología

La estructura de As-p18 consta de un barril β y un motivo hélice-giro-hélice, con una topología de plegamiento relativamente sencilla. Como se ve en la Figura 6.1, las 10 hebras que forman el barril (nombradas desde βA hasta βJ desde el extremo N-terminal hacia el C-terminal) se disponen en forma antiparalela, de manera tal que la hebra $\beta-i$ forma una red de puentes de hidrógeno con las cadenas $i+1$ e $i-1$. Adicionalmente entre la primera y la última hebra también se establecen puentes de hidrógeno, interrumpiéndose esta secuencia de interacciones únicamente entre las hebras βD y βE , donde la mayor distancia entre estas cadenas genera una hendidura en el barril. Dicha hendidura, conocida como “*gap βD - βE* ”, es un rasgo ubicuo de las FABPs, donde las hebras interaccionan mediante sus cadenas laterales y moléculas de agua conservadas (Banazak et al., 1994).

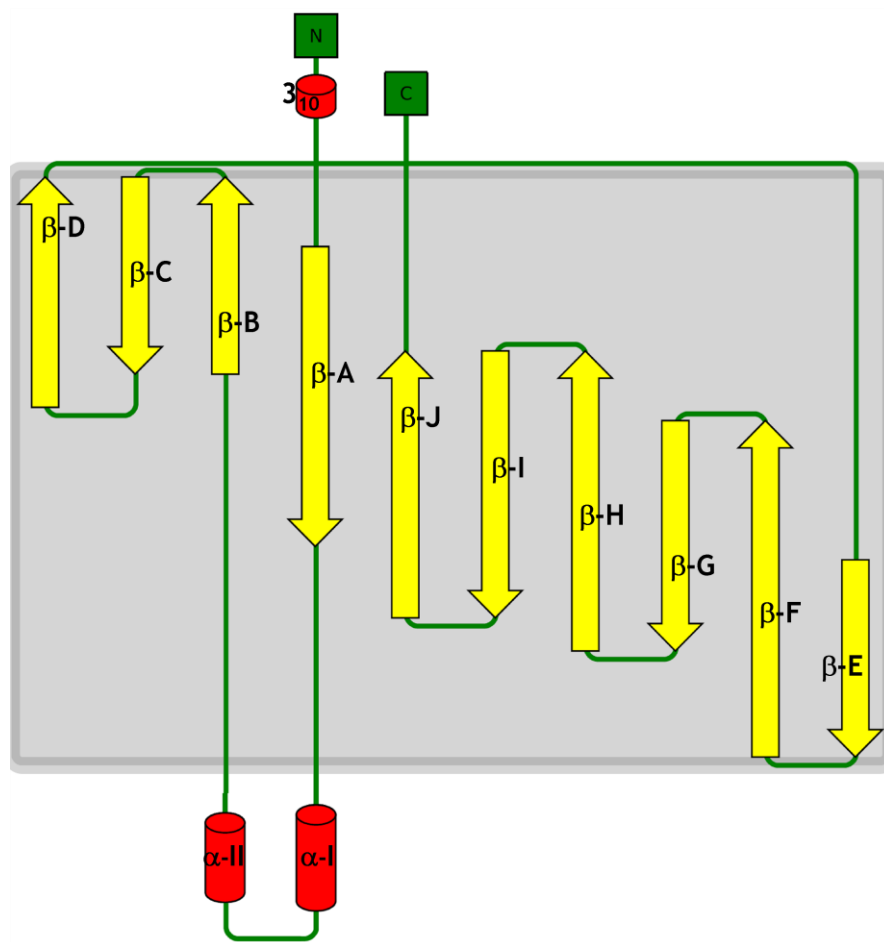


Figura 6.1. Modelo topológico de As-p18. En rojo se indican las hélices α y la hélice 3_{10} . Las hebras β se muestran como flechas amarillas, conformando el barril- β recuadrado en gris. Los extremos N- y C- terminales, así como las conexiones entre segmentos de estructura secundaria, se muestran en verde. Creado con *Pro-origami* (Stivala et al., 2011; <http://munk.csse.unimelb.edu.au/pro-origami/>).

Estructura Tridimensional

La estructura en solución determinada por RMN revela un esferoide, ligeramente aplanado, donde las cadenas antiparalelas se disponen en dos láminas prácticamente ortogonales. Las hebras β A hasta β E y la primera mitad de β F, conforman una de las lámina- β ; y la mitad restante de β F, en conjunto con las hebras β G hasta β J, la otra lámina- β . El motivo hélice-giro-hélice, se dispone entre las hebras β A y β B, posicionándose como una tapa para el barril β (Figura 6.2 A).

En mayor detalle, y de acuerdo a los 20 modelos finales analizados en *PyMOL* y *PROCHECK-NMR* se pueden distinguir en forma representativa a los residuos N-terminales 5Asp-7Phe formando una hélice 3_{10} , que representa un elemento estructural característico de las FABPs de la subfamilia IV (Lücke et al., 2003). A continuación los residuos 10Thr-17Glu forman la hebra β A que se conecta mediante el residuo Asn18

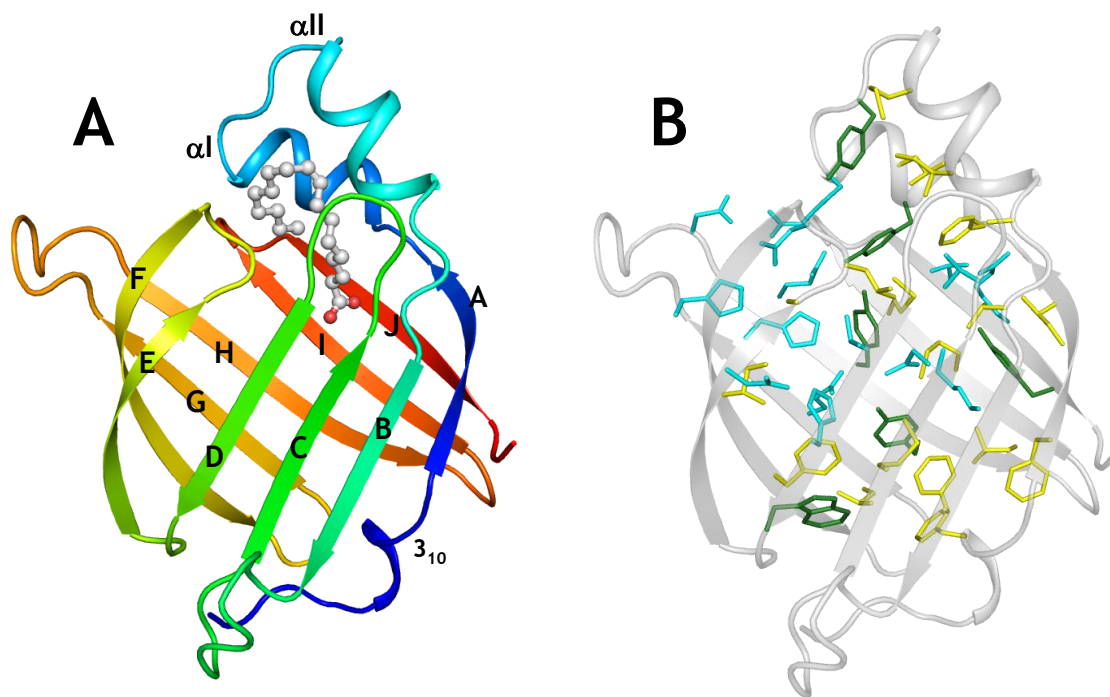


Figura 6.2. A.- Diagrama de cintas de holo-As-p18. Se indica la nomenclatura de los elementos de estructura secundaria. En blanco se muestra el ácido oleico unido. **B.- Distribución de residuos dentro de la cavidad de As-p18.** Según la naturaleza química de los aminoácidos, se colorearon en amarillo (hidrofóbicos), azul (hidrofílicos) y verde (propiedades mixtas: tirosinas).

con la hélice αI . Ésta incluye a los aminoácidos 19Phe-26Arg. Seguidamente, mediante un giro (27Gly-29Gly) se continúa con la hélice αII que se extiende entre los residuos 30Trp-38Leu. La conexión entre la hélice αII y la hebra βB (42Thr-47Asn) consta de los residuos 39Ala-41Val. El resto de la estructura proteica comprende la serie de hebras- β : βC (56Tyr-Leu61), βD (66Asp-72Trp), βE (75Gly-82Ala), βF (85Ser-95Lys), βG (100Leu-105Ile), βH (113Val-121Asp), βI (124Tyr-130Ser), βJ (135 Ser-141Lys), que se hayan unidas por elementos de conexión de longitud variable, globalmente denominados *loops*. Entre ellos se destacan: giro β de tipo I (conectado las hebras βF y βG), giro β de tipo II (entre βI y βJ) y los *loops* Ω , particularmente extendidos, que unen las hebras βB y βC ; y entre βG y βH .

Cavidad interna

El barril- β que posee As-p18 encierra una cavidad central parcialmente ocupada por las cadenas laterales de aminoácidos polares e hidrofóbicos presentes en aproximadamente igual proporción, pero distribuidos de manera desigual. De las 40 cadenas laterales que se proyectan dentro de la cavidad interna de la proteína, 19 son hidrofóbicas

(incluyendo Ala, Val, Ile, Leu, Phe y Met), mientras que las 15 restantes se reparten entre restos hidrofílicos (Arg, Lys, His, Glu, Asn, Asp, o Thr) y 6 de naturaleza mixta (5 Tyr y 1 Trp que tienen propiedades tanto hidrofóbicas como hidrofílicas). La proporción de 48% de residuos totalmente hidrofóbicos vs 52% de aquellos con al menos algún carácter hidrofílico, coincide con lo hallado por Thomson y col. (1999) para LFABP y otras iLBPs. Como se muestra en la Figura 6.2 B, estos residuos se organizan en tres zonas: la parte inferior de la cavidad, con prácticamente todas las cadenas laterales hidrófobas; una sección media enriquecida en grupos hidrófilos e ionizables, y una tercera región en la vecindad del portal que presenta una mezcla de tipos de residuos que interactúan con el ligando. Esta disposición es semejante a la reportada para H-FABP, donde la cavidad también está dividida en tres secciones (Lücke et al., 2002). Para estudiar las dimensiones del bolsillo hidrofóbico de As-p18 se empleó el programa *CASTp* (Liang et al., 1998). En su forma holo se calculó un volumen de 480 \AA^3 , accesible a una sonda de 1.925 \AA (equivalente a un grupo CH_2), que se extendió a 785 \AA^3 al emplear a una sonda de radio de 1.4 \AA (equivalente a una molécula de agua). En forma análoga, se calcularon los volúmenes de los bolsillos de L-FABP y A-FABP (códigos PDB: 1lfo y 1adl) obteniéndose, para una sonda de 1.4 \AA , 1589 \AA^3 y 1119 \AA^3 , respectivamente*. El volumen significativamente menor para As-p18 puede explicarse considerando los aminoácidos que delimitan este espacio. De acuerdo a Thomson y col. (1999), el mayor volumen que registra la cavidad de L-FABP, respecto al de A-FABP, se atribuye a ciertos residuos que recubren la superficie de la cavidad, que son diferentes de una proteína a otra, pero comparten la misma ubicación dentro de ellas. Específicamente, para 5 aminoácidos, las cadenas laterales van cambiando de “pequeñas” a “voluminosas” cuando uno va desde la amplia cavidad de L-FABP a la de tamaño más moderado de A-FABP. Curiosamente –aunque razonable– As-p18 presentó para esas cinco posiciones, aminoácidos tanto o incluso más voluminosos que los que exhibe A-FABP (Figura 6.3).

* Los valores reportados en la literatura (Thomson et al., 1997; Thomson et al., 1999; Capaldi et al., 2006;) utilizan el “*solvent accessible volume*”, pero a efectos de analizar la capacidad de albergar ligandos resultaría más adecuado el uso del “*molecular surface volume*”, que refiere al volumen que la sonda utilizada (hasta su radio) puede acceder dentro el bolsillo. Young y col. (1994) reportan un volumen para la cavidad de H-FABP del orden de los que se reportan aquí, pero no detalla ni la sonda empleada ni a qué volumen se refiere.

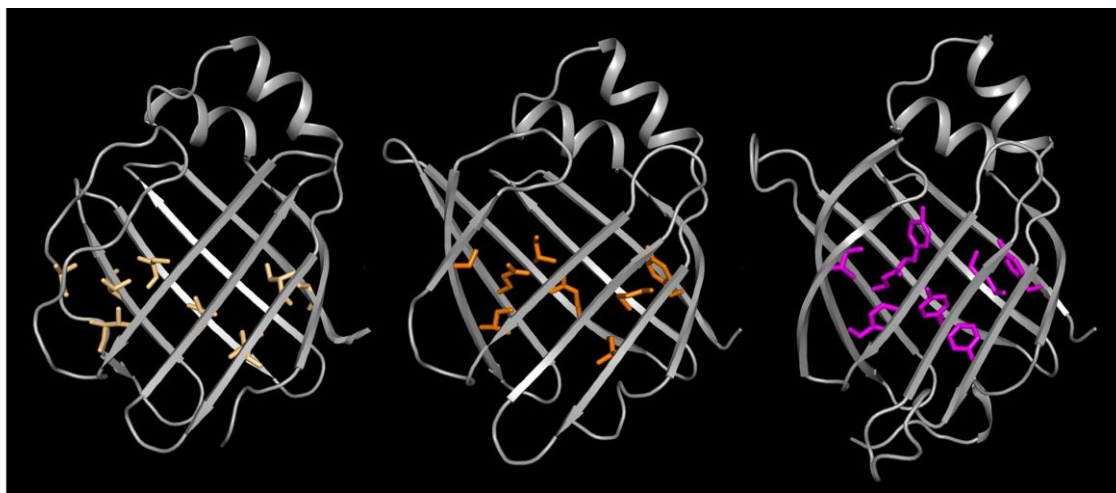


Figura 6.3. Representaciones de L-FABP, A-FABP y As-p18, indicando las cadenas laterales de los residuos enumerados en la Tabla 6.1. Las tres estructuras corresponden a formas holo (Códigos PDB: 1lfo y 1adl para L-FABP y A-FABP, respectivamente). Se aprecia como los residuos pasan de “pequeños” a “voluminosos”, desde L-FABP (a la izquierda, residuos color ocre), pasando por A-FABP (en el medio, residuos color naranja) hasta As-p18 (a la derecha, residuos color magenta).

L-FABP	A-FABP	As-p18
<i>39Ser</i>	<i>40Met</i>	<i>43Lys</i>
<i>93Thr</i>	<i>93Gln</i>	<i>102Glu</i>
<i>100Ser</i>	<i>104Ile</i>	<i>116Tyr</i>
<i>102Thr</i>	<i>106Arg</i>	<i>118Tyr</i>
<i>124Ser</i>	<i>128Tyr</i>	<i>140Tyr</i>
41Ile	42Ile	45Phe
81Ala	82Ser	90Ile
83Val	84Ile	92Phe

Tabla 6.1. Residuos propuestos como responsables de la diferencia de volumen en las cavidades de L-FABP, A-FABP y As-p18. Las primeras 5 filas de residuos corresponden a las establecidas por Thomson y col (1999). Las últimas 3 posiciones, reflejan cadenas laterales más voluminosas para As-p18 en comparación con las otras dos FABPs.

Adicionalmente, se encontraron otras tres posiciones más en las que As-p18 poseía aminoácidos con cadenas laterales más grandes que las que presentaban las otras FABPs (Tabla 6.1). De esta manera, el arreglo particular de aminoácidos del bolsillo hidrofóbico, sería responsable del acusado descenso de volumen de la cavidad. Asimismo, esto podría estar vinculado a la selectividad de unión como se explica en el Capítulo 7.

Si bien la cavidad interna de As-p18 es más pequeña comparada con otras FABPs, alberga, de todos modos, un espacio mayor que el necesario para la unión del ligando (volumen del ácido oleico estimado en 252 \AA^3 según Young et al., 1994 y de $\sim 300 \text{ \AA}^3$ según Meenan et al., 2011). De acuerdo a reportes estructurales por rayos X (Scapin et al., 1992; Kleywegt et al., 1994^a; LaLonde et al., 1994; Young et al., 1994) y RMN de diferentes FABPs (Mesgarzadeh et al., 1998; Wiesner et al., 1999; Likić et al., 2000; Lücke et al., 2002), este espacio restante está ocupado por las moléculas de agua ordenadas que formarían una capa de hidratación para el *cluster* de cadenas laterales hidrofóbicas del fondo de la cavidad, o para algunos átomos de la cadena hidrocarbonada de los ligandos (Xu et al., 1993). Si bien no se condujeron experimentos específicos con el fin de identificar estas moléculas de agua conservadas en As-p18, sí se obtuvo evidencia indirecta de su existencia. Dentro de la cavidad se encontraron en algunos residuos, protones con velocidades de intercambio con el solvente reducidas, que estarían indicando su participación en redes de puentes de hidrógeno. En particular pudieron observarse las resonancias de $69\text{HisN}\delta_1\text{H}\delta_1$, $62\text{ThrH}\gamma_1$, $118\text{TyrH}\eta$ y $136\text{ThrH}\gamma_1$. Posteriormente se corroboró que $69\text{HisN}\delta_1\text{H}\delta_1$ estaba involucrado en un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo 80Asp; mientras que sucedía lo propio con $136\text{ThrH}\gamma_1$ y el carbonilo peptídico de 17Glu. Sin embargo, para $62\text{ThrH}\gamma_1$ y $118\text{TyrH}\eta$ la explicación más probable es que se encuentren formando puentes de hidrógeno con moléculas de agua de intercambio lento.

Por último, y considerando los escenarios de unión de As-p18, se calculó el volumen para uno de los ascarósidos más abundantes presentes en la capa lipídica del huevo de *Ascaris* spp (Wharton, 1980), denominado *ascarosido 4* (Bartley et al., 1996). La notación lineal SMILE del compuesto *ascarosido 4* se obtuvo del sitio: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8707004.html>. El Dr. Smith llevó a cabo el cálculo del volumen del compuesto empleando el programa VOIDOO (Kleywegt et al., 1994^b) que permite estimar el volumen asociado a la envoltura real de la molécula, es decir con una sonda de 0 \AA . Si bien lo riguroso sería el cálculo del volumen de la superficie molecular (*Connolly surface*), este cálculo aproximado de 644 \AA^3 permite predecir que la molécula de *ascarosido 4* si se une a As-p18 probablemente lo haga exhibiendo alguno de sus extremos (la dideoximanosa o el grupo alcohol terminal) por fuera de la cavidad proteica.

Posición del Ligando

La estructura en solución de holo As-p18, mostró un complejo con una sola molécula de oleato. Esta estequiometría 1:1 fue corroborada por los experimentos de titulación que se detallan en el Capítulo 7. Respecto a la posición relativa del ligando, tal como se muestra en la Figura 6.4, se encontró que ocupaba la parte superior de la cavidad de As-p18, cerca de la región portal. Su conformación global presenta alguna similitud a las que exhiben los ácidos grasos unidos a FABPs de la subfamilia IV y a FABPs de parásitos helmintos. Estas semejanzas incluyen, la ubicación del carboxilato, enterrado dentro de la cavidad proteica y la torsión en forma de U en el resto de la cadena alifática (Lalonde et al., 1994; Young et al., 1994; Hohoff, et al., 1999; Balendiran, et al., 2000;

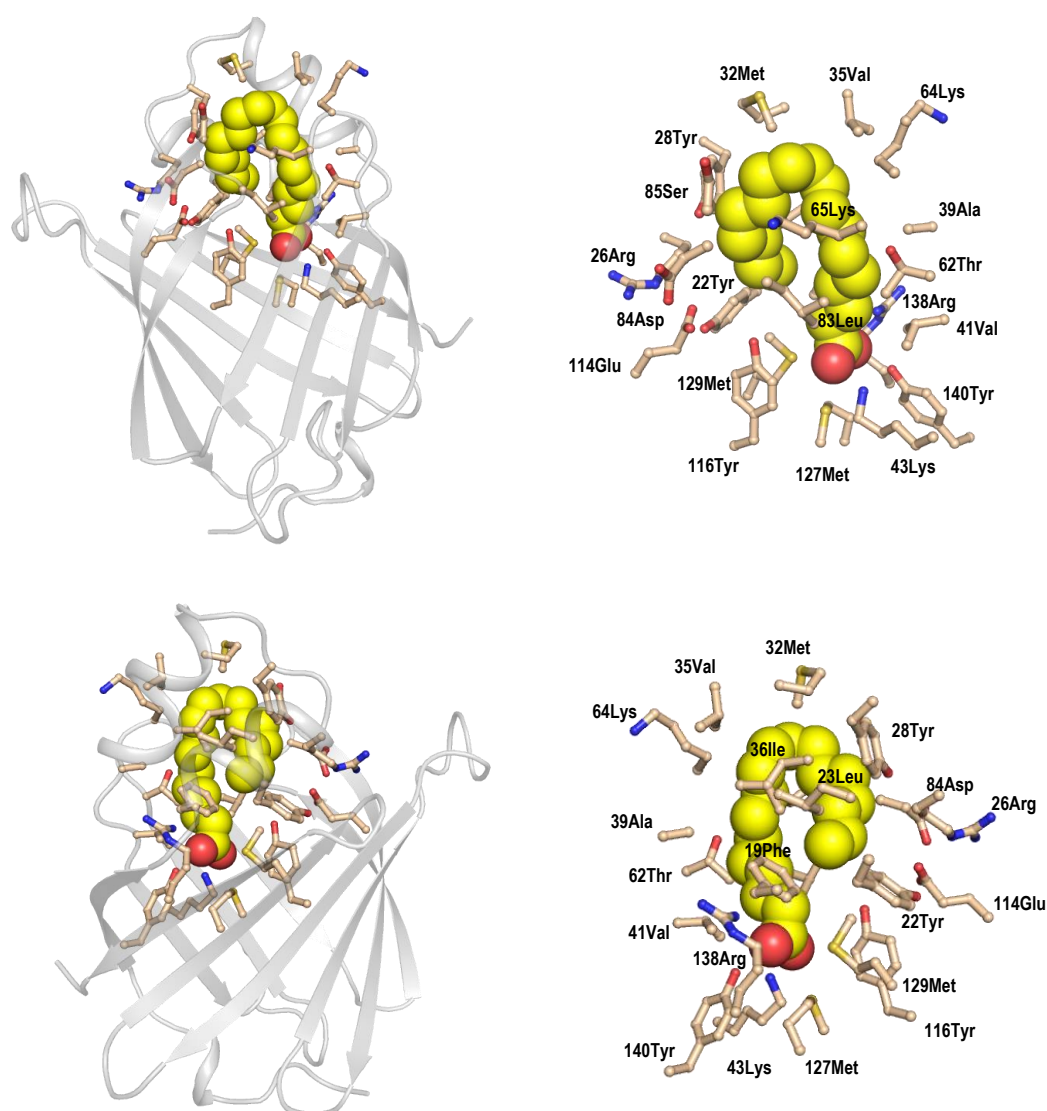


Figura 6.4. Ubicación de la molécula de oleato dentro de la cavidad de As-p18. Las imágenes ampliadas de la derecha muestran en detalle las cadenas laterales en proximidad con el ligando. Las imágenes de abajo están rotadas 180°, respecto de las de arriba a fin de mostrar las caras anterior y posterior de la estructura de As-p18.

Jakobsson et al., 2003; Angelucci et al., 2004). Sin embargo, el carboxilato se ubicó en una posición relativamente menos profunda. Esto se debe principalmente a los aminoácidos 118Tyr y 43Lys (y en menor medida a 127Met y 60Asn) que tal como se comentó en la sección anterior, poseen cadenas laterales más voluminosas, ocupando un espacio mayor en la base de la cavidad. Por otra parte, la manera en la que el ácido graso se curva en el interior del bolsillo hidrofóbico también presentó características inusuales. Primero, la sección de C-1 a C-7 se extiende de manera más o menos vertical hacia la región delimitada entre la hélice α II y los *loops* β B- β C y β D- β E. Asomando sobre la superficie de la proteína, entre C-8 y C-11, ocurre una torsión en la cadena haciendo que el segmento terminal descienda nuevamente, pero con una orientación posterior, hacia la hélice α -I. De esta manera, el grupo metilo terminal interactúa mayormente con residuos de α -I, pero también con los de la hebra β I y con los de la hélice α -II. En las FABPs de la subfamilia IV, por lo general (y en las FABPs de parásitos, EgFABP1 y SjFABP), sus ligandos describen un camino en dirección opuesta, primero acercándose a las hebras β H y β I a medida que ascienden, y luego de curvarse, se dirigen nuevamente al interior del bolsillo, frente a los residuos de las hebras β C y β D. Como se ve en la Figura 6.5, mientras que el ácido oleico en As-p18 se tuerce en sentido “*antihorario*” de C1 a C18, el resto de los ligandos en las otras

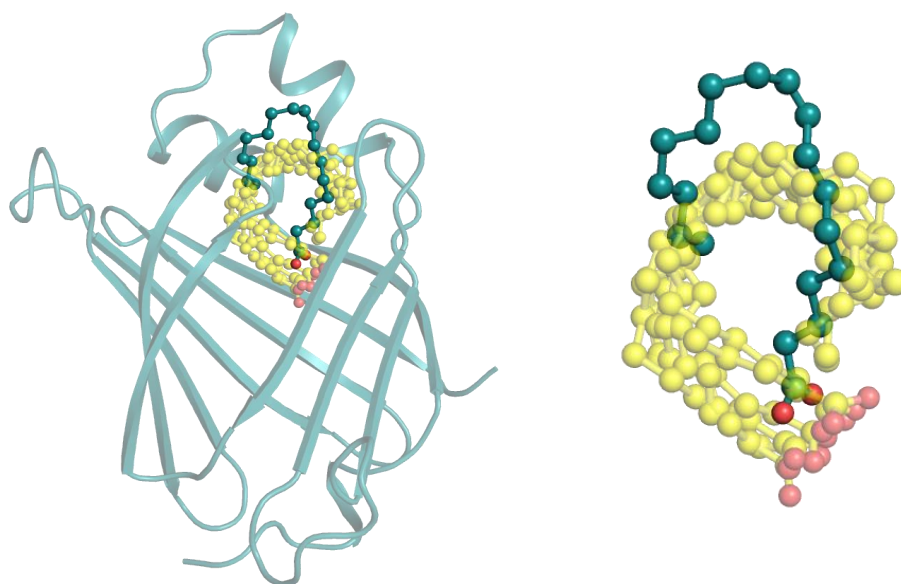


Figura 6.5. Comparación de las posiciones que adoptan diversos ligandos dentro de la cavidad de distintas FABPs. En amarillo se muestran las siguientes moléculas de ligando: Araquidonato en AFABP (PDB: 1ADL); Oleato en HFABP y en SjFABP (PDB: 1HMS y 1VYF, respectivamente); Palmitato en EFABP y en EgFABP (PDB: 1B56 y 1O8V, respectivamente). En verde azulado se muestra la estructura de As-p18 con la molécula de oleato en su disposición particular.

FABPs, lo hace en sentido “*horario*”. Esta disposición inusual se atribuye a que las cadenas laterales internas en las hebras β H y β I se encuentran más cercanas al centro de la cavidad y con residuos que ocupan un volumen mayor. En particular se distinguieron a la 116Tyr y 129Met como principales limitantes en As-p18 que impedirían que el ácido graso adopte la disposición usual.

Interacciones Ligando:Proteína

Como se puede apreciar en la Figura 6.4, las interacciones entre As-p18 y el oleato (OLA) unido son extensas. El grupo carboxilato del ligando está enterrado en la sección media de la cavidad proteica. Las interacciones más relevantes que presentaría por proximidad, incluyen al grupo hidroxilo de 140Tyr, el grupo guanidinio de 138Arg, y el grupo ϵ -amino de 43Lys, estabilizando la carga negativa del carboxilato del ácido graso. Esta triada que interacciona con el carboxilato, integrada por cadenas laterales polares/ básicas, incluyendo una arginina, es similar a la triada canónica (Hamilton, 2004) que se encuentra en las FABPs del grupo IV (Xu et al., 1993; Bernlohr et al., 1997) y de invertebrados (Lücke et al., 2006; Jakobsson et al., 2003; Angelucci et al., 2004; Benning et al., 1992). Sin embargo, en As-p18 esta red está compuesta de manera ligeramente diferente. En lugar de la arginina altamente conservada en el extremo C-terminal de la hebra β -H (106Arg en AFABP), As-p18 posee un residuo de tirosina (118Tyr). La cadena lateral que sustituye a la conservada 106Arg de AFABP en la unión del grupo carboxilato del ácido graso, es 43Lys, orientada hacia adentro en la primera parte de la hebra β -B.

Respecto a la cadena hidrocarbonada del oleato, las interacciones derivadas de una proximidad menor a 4 Å en la estructura tridimensional se resumen en la Tabla 6.2, encontrándose una concordancia satisfactoria con las restricciones experimentales. Los residuos involucrados provienen principalmente de las hélices α I y α II y de las hebras del extremo C-terminal. Respecto a su naturaleza, se halló una combinación de residuos polares e hidrofóbicos en proporción semejante. Más allá de la proporción comparable de aminoácidos, se encontró que muchos de los residuos polares (64Lys, 65Lys, 85Asp, 85Ser) se acomodaban de forma tal que la proximidad con el ligando ocurría en sus porciones alifáticas o de la cadena principal del aminoácido. De esta manera el entorno inmediato de la molécula de OLA resultó predominantemente hifrobóbico.

Sección de la cadena de OLA	Residuos interaccionando con OLA	Posición relativa en la estructura de As-p18
C1-C7	41Val	β B
	43Lys	β B
	62Thr	loop C-D
	83Leu	loop E-F
	116Tyr	β H
	127Met	β I
	129Met	β I
	138Arg	β J
	140Tyr	β J
C8-C11	32Met	α II
	35Val	α II
	36Ile	α II
	64Lys	loop C-D
	65Lys	loop C-D
	85Ser	β F
C11-C18	19Phe	α I
	22Tyr	α I
	23Leu	α I
	26Arg	α I
	28Tyr	Turn α I- α II
	36Ile	α II
	84Asp	loop C-D
	114Glu	β G

Tabla 6.2. Interacciones entre la molécula de oleato y residuos de As-p18, discriminado por secciones. Se consideró una distancia no mayor a 4 Å en la estructura para determinar la interacción. La última columna indica la ubicación relativa de los residuos en la estructura proteica.

Superficie de As-p18

Algunas de las propiedades funcionales únicas de ciertas FABPs pueden ser dictadas en gran medida por las características estructurales de sus superficies, en lugar de serlo estrictamente por la especificidad de unión al ligando (Storch & McDermott, 2009). En consecuencia, resulta pertinente la descripción de la superficie de As-p18.

De los 79 residuos expuestos en la superficie de As-p18, se encontró una evidente mayoría de residuos hidrofílicos (65 aminoácidos) por sobre los hidrofóbicos (7 aminoácidos) y los de naturaleza dual (7, que incluyen Pro, Tyr y Trp) (Figura 6.6). Esta

distribución de superficies hidrofóbicas/hidrofílicas no presentó similitud aparente con ninguna de las cinco FABPs de vertebrados descritas por LiCata y Bernlohr (1998), lo cual no sería un hecho inesperado teniendo en cuenta la baja similitud de secuencia entre As-p18 y sus contrapartes. Analizando más en detalle la naturaleza de los residuos polares en superficie, se encontró un leve predominio de residuos cargados positivamente (23, entre Arg His y Lys), seguido de los polares sin carga (Asn, Gln, Thr, Ser, 22 en total) y los cargados negativamente (Asp y Glu, 20 residuos). Si bien las cadenas laterales hidrófobas y polares se observaron dispersas, sin un patrón definido aparente que sugiriera sitios de reconocimiento para otras proteínas, y/o membranas, una inspección meticulosa reveló potenciales regiones de interés. Interessantemente As-p18 exhibe el llamado “cuarteto de cargas”, reconocido como posible dominio de interacción con proteínas regulatorias del metabolismo lipídico (Smith et al., 2008). Este cuarteto de cargas conservado en las FABPs que presentan interacción con lipasas (todas ellas de la subfamilia IV exclusivamente), se ubica en el dominio hélice-vuelta-hélice y consiste en los aminoácidos 17Asp, 18Asp, 21Lys y 30Arg según la numeración en la AFABP de ratón. De manera homóloga, As-p18 presenta en idéntica

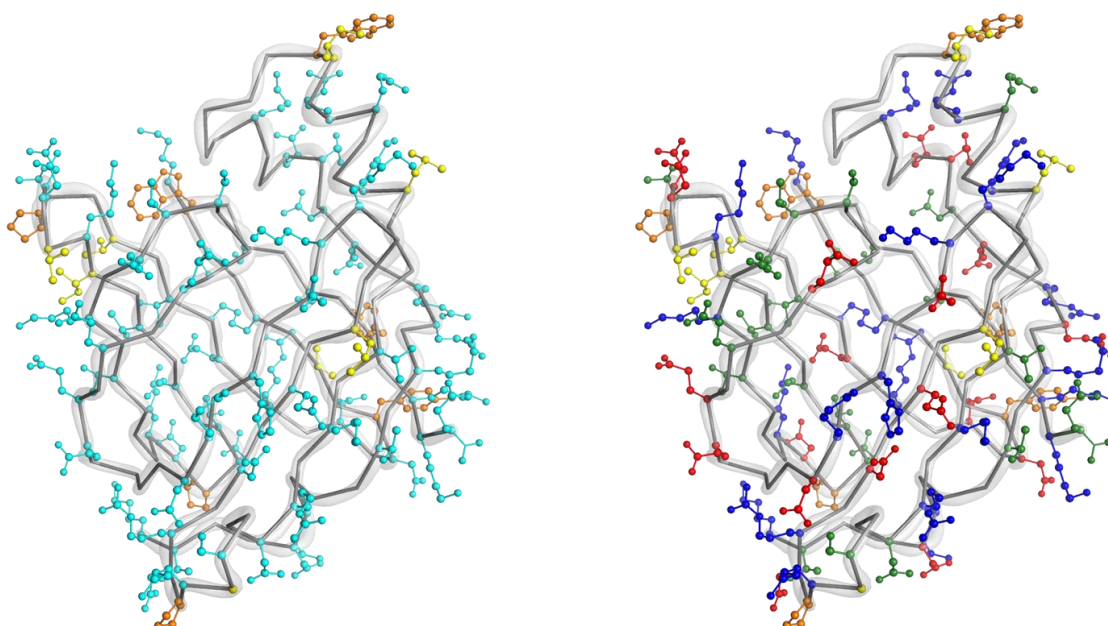


Figura 6.6. Cadenas laterales expuestas en la superficie de As-p18. A la izquierda, los residuos polares (con o sin carga) se colorearon en cian (D, E, H, K, N, Q, R, S, T), los hidrofóbicos en amarillo (I, L, V) y aquellos de naturaleza anfifílica en naranja (P, W, Y). A la derecha se discriminan los residuos polares en: cargados positivamente (color azul, H, K, R), negativamente (color rojo, D, E) y sin carga (verde, N, Q, S, T).

posición a los residuos 20Asp, 21Glu, 24Lys y 33Arg. En este sentido, se remarca la gran similitud en toda la extensión del motivo hélice-vuelta-hélice con las FABPs de la subfamilia IV, incluyendo a la hélice α -I anfipática, lo cual tendría relevancia en el mecanismo de transferencia de ácidos grasos (Zimmerman & Veerkamp, 2002) y en la interacción con membranas (Córsico et al., 1998; Córscico et al., 2004).

Otros elementos que se destacan sobre la superficie de As-p18 son la Gly 37 vinculada a la movilidad de α -II en LFABP (Cai et al., 2012), que no está presente en los miembros de la subfamilia IV, previamente analizados y que podría ejercer un rol similar en la movilidad de la hélice α -II en As-p18.

Como se ve en la Figura 6.7, no se evidenciaron grandes áreas sin carga que correspondieran a parches hidrofóbicos. Sí se apreciaron zonas de potencial positivo bordeando la región portal. Este tipo de distribución de potencial positivo que incluye a la 65Lys en la periferia del portal estaría involucrada en guiar al ácido graso, conduciéndolo hacia el bolsillo hidrofóbico por interacción con el COO^- (Young et al., 1994). Como se mencionó previamente, el motivo hélice-vuelta-hélice de As-p18 se asemeja al de las FABPs de la subfamilia IV y presenta un potencial de carga neto positivo. Esta característica es de relevancia ya que se haya establecido que los residuos catiónicos en la superficie de esta región juegan un papel fundamental para establecer interacciones de tipo electrostáticas con membranas fosfolipídicas en las FABPs que

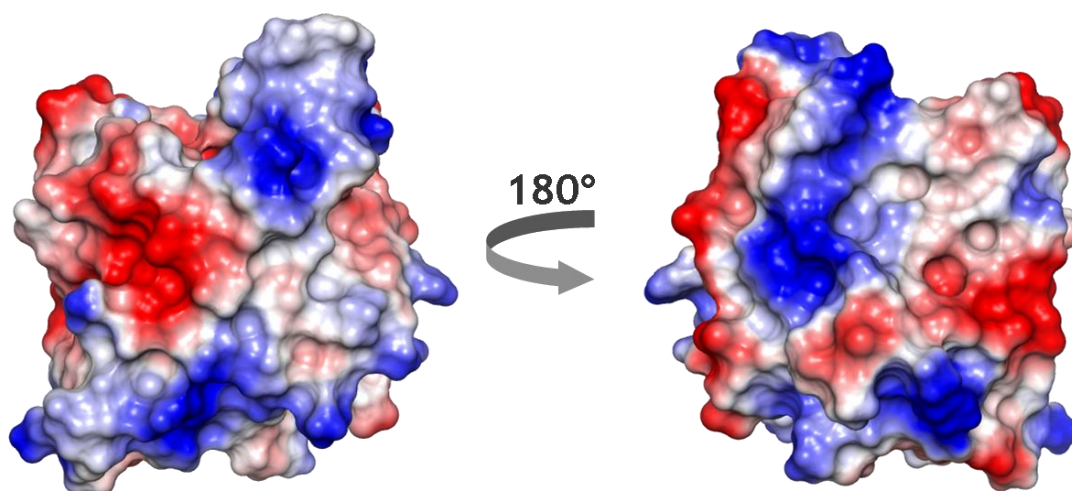


Figura 6.7. Potencial electrostático de superficie de holo-As-p18. A la izquierda se muestra una vista frontal de la molécula, orientada de la misma manera que el resto de las figuras. A la derecha, una vista posterior, donde se rotó 180° a lo largo del eje transversal. En azul se muestran los potenciales positivos; en rojo, los negativos y sin color las zonas no cargadas. La imagen y la distribución de potencial en superficie se realizaron con el programa PyMOL.

transfieren sus ligandos mediante un mecanismo denominado “colisional” (Liou et al., 2002; Falomir-Lockhart et al., 2006). Por último también se aprecia una zona de potencial positivo en la base del barril β , que también podría tener implicancias en el mecanismo de transferencia de ácidos grasos.

Loops

Los *loops* abarcan porciones de estructura secundaria no regular, de longitud variable, sin un patrón definido en los ángulos diedros. Dentro de este amplio concepto, se encuentran los *loops* Ω , definidos como aquellos que presentan una longitud mayor o igual a seis aminoácidos, con o sin puentes de hidrógeno internos, de ubicación superficial y de funciones diversas (Fetrow, 1995). Una de las diferencias más notables entre As-p18 y el resto de las FABPs de estructura resuelta se da en los *loops* Ω , apreciablemente extendidos, que conectan las hebras β B y β C, y β G y β H (Figura 6.8). En comparación con la AFABP de ratón (PDB=1ADL, elegida porque presenta una de las estructuras más similares a As-p18 de acuerdo a al programa *DALI* y en base a comparaciones publicadas previamente por Mei y col. (1997)), el *loop* B-C es el doble de largo en As-p18. Mientras que este *loop* en AFABP tiene cuatro residuos (45Asn, 46Gly, 47Asp y 48Leu), en As-p18 posee ocho (48Ala, 49Ala, 50Ser, 51Gly, 52Lys, 53Pro, 54Asp y 55Arg). Además de la diferencia en longitud, las tres cadenas laterales cargadas invierten la carga general del *loop*, rindiendo una carga neta positiva en lugar de una negativa como sucede en A-FABP. Por otra parte, el *loop* entre las hebras β G y β H, también se extiende en As-p18, donde seis residuos (107Val, 108Asp, 109Asp, 110Pro, 111Thr, 112Asp) confieren una carga neta negativa, a diferencia de lo que sucede en AFABP donde sólo se encuentran tres residuos (98Asp, 99Gly, 100Lys) con una carga total neutra. Si bien las FABPs de la subfamilia I exhiben *loops* Ω entre las hebras β G y β H (Marcelino et al., 2006), un análisis de secuencias y estructuras reveló que el *loop* Ω BC, sólo se encuentran en las nemFABPs. La única excepción para la exclusividad del *loop* Ω BC, sería una FABP del parásito cestode *Taenia solium*, TsFABP2, donde estudios por homología predicen una inserción apreciable entre las hebras β B y β C (Kim et al., 2012). En cuanto al rol que podrían jugar, es interesante notar que estos dos *loops* Ω en la estructura de As-p18 no se encuentran agrupados sobre una misma superficie, por lo que sus potenciales participaciones probablemente sean independientes entre sí. Dentro de las funciones propuestas y demostradas para los *loops* Ω se incluyen la unión a moléculas sustrato, inhibidores e iones metálicos y el

reconocimiento proteína-proteína. Asimismo, también se ha demostrado el rol clave de los *loops* Ω en la estabilidad de las estructuras proteicas, así como durante el proceso de plegamiento (Fetrow, 1995; Hermoso et al., 2009; Regad et al., 2011).

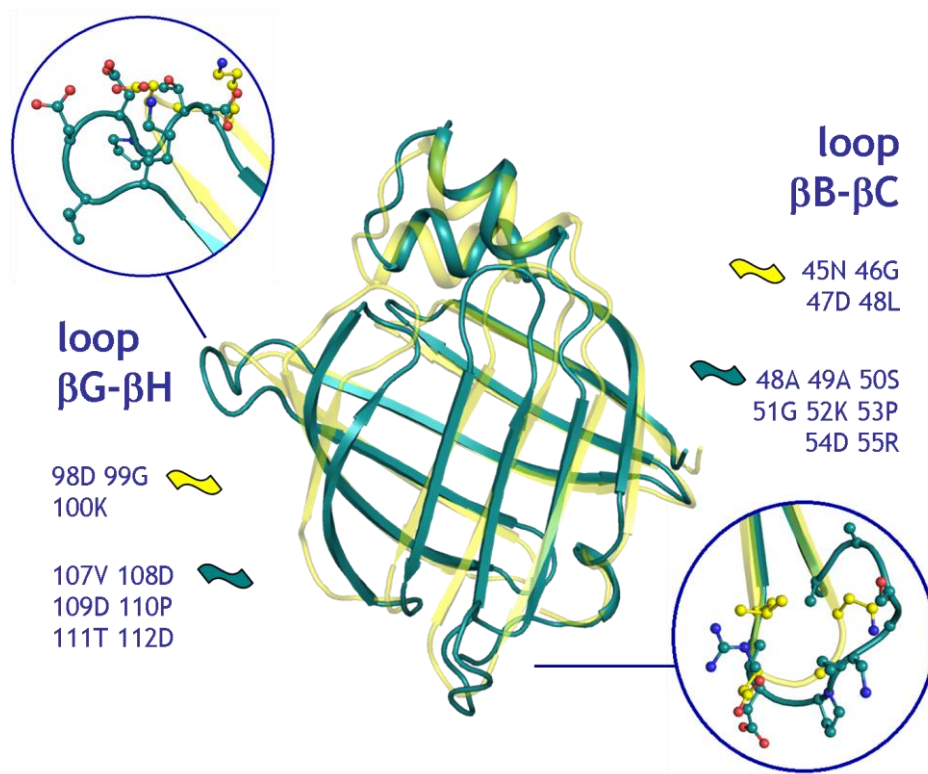


Figura 6.8. Loops en As-p18 y AFABP. Diagrama de cintas de AFABP en amarillo (Código PDB: 1adl) y de As-p18 en verde-azulado. Se destacan los *loops* particularmente extendidos en As-p18 y se muestra la secuencia de aminoácidos para ambas proteínas.

Residuos Hidrofóbicos Expuestos en Superficie

Otro aspecto interesante que surge de comparar distintas secuencias y estructuras de FABPs comprende a ciertos residuos hidrofóbicos que sobresalen en la superficie de la hélice α -II. En esta región, As-p18 expone hacia el solvente tres residuos hidrofóbicos: 30Trp, 31Ile y 38Leu. Curiosamente, las cadenas laterales hidrofóbicas voluminosas expuestas en esta zona se encuentran conservadas para ciertas FABPs y se los conoce como "dedos pegajosos" (*sticky fingers*) (Kennedy & Beauchamp, 2000). Estos *sticky fingers* jugarían un rol importante en interacciones proteína:membrana o proteína:proteína. Un hallazgo que refuerza esta hipótesis es la presencia constante de estos residuos en las FABPs que intercambian ligandos mediante un mecanismo que implica el contacto directo con las membranas (mecanismo colisional), pero no así en las FABPs que intercambian ligandos de una manera alternativa (mecanismo difusional)

(Gericke et al., 1997; Hsu & Storch, 1996; Storch & Bass, 1990; Angelucci et al., 2004). De esta manera, los residuos 30Trp y 38Leu ubicados en posiciones análogas a 27Phe y 35Met en la α -hélice II de AFABP, podrían indicar que si As-p18 participara en algún evento de transferencia de ligandos a membranas, lo haría por un mecanismo colisional.

6.3 As-p18: Punto de Partida para Elucidar Estructuras de Otras nemFABPs

Durante el transcurso de esta Tesis, se trabajó con otras proteínas candidatas para ser estudiadas por RMN (ver Apéndices I y J). En particular para la FABP del parásito nematode *Brugia malayi*, denominada, Bm-FAB-1 (Michalski et al., 2002), llegaron a obtenerse espectros ^1H y ^{15}N -HSQC que indicaron un plegamiento correcto en la muestra y la factibilidad de determinar su estructura por esta técnica (ver Apéndice J). Sin embargo por una cuestión de tiempo, solo se continuaron los estudios con As-p18. Dada las particularidades compartidas de forma exclusiva dentro del grupo de las nemFABP, resultó interesante ensayar la predicción de estructura para un miembro del *cluster* (Bm-FAB-1) a partir de As-p18. Como se ve en la Figura 6.9, el alineamiento de As-p18 y Bm-FAB-1 mostró un alto porcentaje de identidad de secuencia (71 %), asegurando en gran medida la exactitud de la estructura a modelar (Eswar et al., 2007).



Figura 6.9. Alineamiento de secuencias de As-p18 y Bm-FAB-1. Para ambas proteínas se utilizaron las secuencias de las formas maduras. El alineamiento se hizo desde *Biology Workbench* (<http://workbench.sdsc.edu/>), empleando el programa *ALIGN* (Myers & Miller, 1988). Para la visualización del alineamiento se empleó *Jalview* (Waterhouse et al., 2009) con esquema de colores *CLUSTAL*.

Para el modelado se utilizó el programa *MODELLER* (Sali & Blundell, 1993; Eswar et al., 2007) en su versión 9.11. El cálculo comparativo que lleva a cabo este programa predice la estructura 3D de una secuencia *target*, basándose en el alineamiento con una

o más proteínas de estructura conocida. Asimismo, el modelado por homología se realiza mediante el cumplimiento de restricciones espaciales. En este trabajo se emplearon como moldes o *templates*, los 20 conformeros del *ensemble* de As-p18 obtenidos por RMN, y se configuró el *script* a fin de producir diez modelos de Bm-FAB-1 finales. La Figura 6.10 muestra la estructura de Bm-FAB-1 de menor energía, superpuesta con la de As-p18, donde se aprecia la gran similitud entre ambas, tanto en el plegamiento global como en las características estructurales exclusivas del *cluster* de nemFABPs. Respecto a las inserciones de varios aminoácidos que presentan las secuencias de nemFABPs, es importante resaltar el uso de un *template* lo suficientemente relacionado a la secuencia *target* al momento de construir un modelo por homología. En caso contrario, los alineamientos y el modelado suelen ser proclives a presentar errores (Eswar et al., 2007). Tal es el caso del modelo tridimensional de As-p18 basado en una FABP de mamífero, previamente reportado, donde dos de tres inserciones de aminoácidos del alineamiento de secuencias se acomodaron erróneamente entre las hebras β C- β D y al final de la hélice α -II (Mei et al., 1997). Por su parte, en el modelo tridimensional de Bm-FAB-1 basado en la estructura de As-p18 se pudo constatar la ubicación correcta de estas inserciones coincidentes con los *loops* extendidos entre las hebras β B- β C y β G- β H. De particular interés resulta la comparación de los residuos orientados hacia la cavidad, próximos al ligando. Como se observa en el panel derecho de la Figura 6.10, existe una notable coincidencia en la identidad y/o naturaleza de los aminoácidos que integran el sitio de unión. Su gran similitud proporciona la posibilidad de inferir afinidades por un conjunto común de moléculas capaces de unirse a ambas cavidades. Esto último reviste importancia en la eventual búsqueda de inhibidores de las nemFABPs, considerando que la especificidad de asociación con drogas reportadas para otras FABPs se haya estrechamente vinculada a la posición y naturaleza de los mencionados aminoácidos (Furuhashi et al., 2007; Barf et al., 2009; Hertz et al., 2009; Berger et al., 2012).

El conjunto de modelos de Bm-FAB-1 presentó un 99% de sus residuos en las dos regiones más favorables en el gráfico de Ramachandran, y una geometría global satisfactoria, cuando se lo evaluó mediante el programa *PROCHECK* (Laskowski et al., 1996). Para este análisis, se restringió la selección de aminoácidos en la región N terminal, ya que los siete primeros en la secuencia de Bm-FAB-1 no se corresponden a ninguna porción en el alineamiento con As-p18, y por ende no presenta estructura definida. Si bien habría indicios indirectos de que esta corta secuencia se halla en la

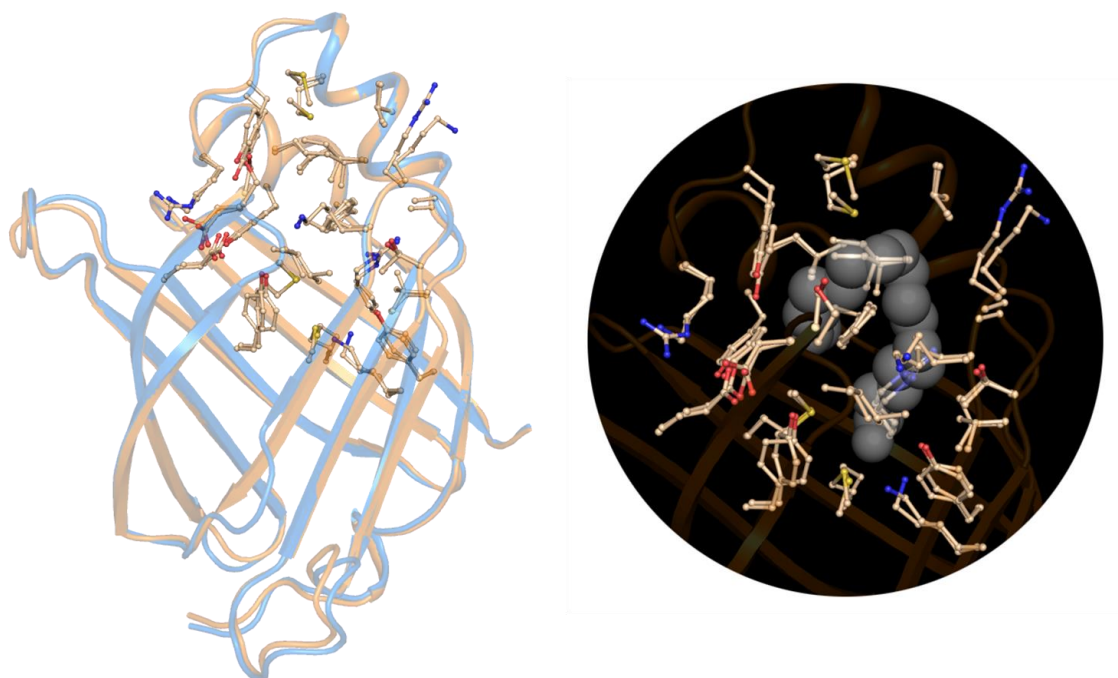


Figura 6.10. Representación de cintas de las estructuras de Bm-FAB-1 y As-p18. Se muestra en azul, Bm-FAB-1 y en naranja, As-p18. Se excluyeron los primeros siete residuos de Bm-FAB-1 y el *tag* de histidina en As-p18. A la derecha se resaltan las cadenas laterales orientadas hacia el sitio de unión a ligando.

proteína madura (Michalski et al., 2002) no se ha corroborado su presencia por secuenciación de la proteína.

6.4 Conclusiones

La estructura en solución de As-p18 es coincidente con el plegamiento canónico descrito para las FABPs. El mismo consta de un barril de hebras β antiparalelas, cerrado por un dominio hélice-vuelta-hélice. Se encuentran en su estructura los componentes típicos de esta familia de proteínas, como la hendidura β D- β E, la región portal y el bolsillo hidrofóbico donde se acomoda el ligando. Adicionalmente, presenta algunos elementos estructurales previamente descritos para la subfamilia IV como la hélice 3_{10} en el extremo N-terminal, y la organización en tres zonas para los residuos que integran la cavidad interna.

Sin embargo, la estructura de As-p18 muestra características únicas que serían exclusivas para el *cluster* de nemFABPs. De especial atención son los *loops* Ω

extendidos entre las hebras β B- β C y β G- β H y la posición que adopta el ligando dentro del bolsillo de unión de As-p18.

Respecto al papel de los *loops* Ω , no se cuenta con evidencia experimental que apunte hacia un rol específico. En este sentido, sería necesario que se revelen más piezas de información sobre la biología del parásito y los escenarios presentes en el entorno natural de la proteína. Eventualmente, algunas de las potenciales funciones podrían evaluarse mediante el uso de mutantes o inferirse a través de algoritmos computacionales (Hermoso et al., 2009).

En relación a la cavidad interna, se encontró una asociación entre la identidad y el arreglo particular de aminoácidos del bolsillo hidrofóbico, con el volumen disponible y la disposición inusual encontrada para la molécula unida de OLA. Estos factores probablemente se encuentren vinculados a la especificidad de ligando y la función que cumple en su entorno nativo. También influirían potencialmente en la velocidad de transferencia del ligando a membranas modelo.

Comparaciones de los residuos expuestos en superficie, y en especial, el potencial neto positivo en la región portal, anticipan para As-p18 una similitud en el mecanismo de transferencia de ácidos grasos exhibido por las FABPs de tipo colisional (Storch & Thumser, 2000).

Basado en la semejanza a nivel secuencial, estudios preliminares por RMN y modelados por homología se prevé que la estructura de As-p18 refleje de manera representativa las características estructurales de este nuevo *cluster* de FABPs de nematodos. Esto puede ser aprovechado para abordar estudios de relevancia farmacológica en nemFABPs que sean potenciales blancos de acción o que actúen como transportadores de antihelmínticos.

6.5 Bibliografía

Angelucci F, Johnson KA, Baiocco P, Miele AE, Brunori M, Valle C, Vigorosi F, Troiani AR, Liberti P, Cioli D, Klinkert MQ, Bellelli A. (2004) *Schistosoma*

mansoni fatty acid binding protein: specificity and functional control as revealed by crystallographic structure. *Biochemistry* 43(41):13000-11.

Balendiran GK, Schnutgen F, Scapin G, Borchers T, Xhong N, Lim K, Godbout R, Spener F, Sacchettini JC. (2000) Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 275(35): 27045-27054.

Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. (1994) Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem* 45:89-151.

Barf T, Lehmann F, Hammer K, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, Rondahl L, Lundbäck T. (2009) N-Benzyl-indolo carboxylic acids: Design and synthesis of potent and selective adipocyte fatty-acid binding protein (A-FABP) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19(6):1745-8.

Bartley JP, Bennett EA, Darben PA. (1996) Structure of the ascarosides from *Ascaris suum*. *J Nat Prod* 59(10):921-6.

Berger WT, Ralph BP, Kaczocha M, Sun J, Balius TE, Rizzo RC, Haj-Dahmane S, Ojima I, Deutsch DG. (2012) Targeting fatty acid binding protein (FABP) anandamide transporters - a novel strategy for development of anti-inflammatory and anti-nociceptive drugs. *PLoS One* 7(12):e50968.

Benning MM, Smith AF, Wells MA, Holden HM. (1992) Crystallization, structure determination and least-squares refinement to 1.75 Å resolution of the fatty-acid-binding protein isolated from *Manduca sexta* L. *J Mol Biol* 228(1):208-19.

Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzler AV, Banaszak LJ. (1997) Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 17:277-303.

Cai J, Lücke C, Chen Z, Qiao Y, Klimtchuk E, Hamilton JA. (2012) Solution structure and backbone dynamics of human liver fatty acid binding protein: fatty acid binding revisited. *Biophys J*. 102(11):2585-94.

Capaldi S, Guariento M, Perduca M, Di Pietro SM, Santomé JA, Monaco HL. (2006) Crystal structure of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) liver bile acid-binding protein bound to cholic and oleic acid. *Proteins* 64(1):79-88.

Córsico B, Cistola DP, Frieden C, Storch J. (1998) The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12174-8.

Córsico B, Liou HL, Storch J. (2004) The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty

acids to phospholipid membranes. *Biochemistry* 43, 3600-7.

Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. (2007) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 2:Unit* 2.9.

Falomir-Lockhart LJ, Laborde L, Kahn PC, Storch J, Córsico B. (2006) Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes. Support for a multistep process. *J Biol Chem* 281(20):13979-89.

Fetrow JS. (1995) Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability. *FASEB J* 9(9):708-17.

Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS. (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447(7147):959-65.

Gericke A, Smith ER, Moore DJ, Mendelsohn R, Storch J. (1997) Adipocyte fatty acid-binding protein: interaction with phospholipid membranes and thermal stability studied by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 36(27):8311-7.

Hamilton JA. (2004) Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us. *Prog Lipid Res* 43(3):177-99.

Hermoso A, Espadaler J, Enrique Querol E, Aviles FX, Sternberg MJ, Oliva B, Fernandez-Fuentes N. (2009) Including Functional Annotations and Extending the Collection of Structural Classifications of Protein Loops (ArchDB). *Bioinform Biol Insights* 24;1:77-90.

Hertzler AV, Hellberg K, Reynolds JM, Kruse AC, Juhlmann BE, Smith AJ, Sanders MA, Ohlendorf DH, Suttles J, Bernlohr DA. (2009) Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *J Med Chem* 52(19):6024-31.

Hohoff C, Borchers T, Rüstow B, Spener F, van Tilbeurgh H. (1999) Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. *Biochemistry* 38(38):12229-39.

Hsu KT, Storch J. (1996) Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem* 271(23):13317-23.

- Jakobsson E, Alvite G, Bergfors T, Esteves A, Kleywegt GJ. (2003) The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim Biophys Acta* 1649(1):40-50.
- Kennedy MW, Beauchamp J. (2000) Sticky-finger interaction sites on cytosolic lipid-binding proteins? *Cell Mol Life Sci* 57(10):1379-87.
- Kim SH, Bae YA, Yang HJ, Shin JH, Diaz-Camacho SP, Nawa Y, Kang I, Kong Y. (2012) Structural and binding properties of two paralogous fatty acid binding proteins of *Taenia solium* metacestode. *PLoS Negl Trop Dis* 6(10):e1868.
- Kleywegt GJ, Bergfors T, Senn H, Le Motte P, Gsell B, Shudo K, Jones TA. (1994a) Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-trans-retinoic acid and a synthetic retinoid. *Structure* 2(12):1241-58.
- Kleywegt GJ, Jones TA. (1994b) Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 2):178-85.
- LaLonde JM, Bernlohr DA, Banaszak LJ. (1994) X-ray crystallographic structures of adipocyte lipid-binding protein complexed with palmitate and hexadecanesulfonic acid. Properties of cavity binding sites. *Biochemistry* 33(16):4885-95.
- Laskowski RA, Rullmann JAC, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8: 477-486.
- Liang J, Edelsbrunner H, Woodward C. (1998) Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci* 7(9):1884-97.
- LiCata VJ, Bernlohr DA. (1998) Surface properties of adipocyte lipid-binding protein: Response to lipid binding, and comparison with homologous proteins. *Proteins*. 33(4):577-89.
- Likić VA, Juranić N, Macura S, Prendergast FG. (2000) A "structural" water molecule in the family of fatty acid binding proteins. *Protein Sci* 9(3):497-504.
- Liou HL, Kahn PC, Storch J. (2002) Role of the helical domain in fatty acid transfer from adipocyte and heart fatty acid-binding proteins to membranes: analysis of chimeric proteins. *J Biol Chem* 277(3):1806-15.
- Lücke C, Huang S, Rademacher M, Rüterjans H. (2002) New insights into intracellular lipid binding proteins: The role of buried water. *Protein Sci* 11(10):2382-92.
- Lücke C, Gutierrez-Gonzalez H, Hamilton JA. (2003) Intracellular lipid binding proteins: evolution, structure, and lipid binding. In: Cellular proteins and their fatty acids in health and disease (eds. Dutta-Roy A & Spener F). Weinheim, Germany: Wiley VCH; p. 95-114.
- Lücke C, Qiao Y, van Moerkerk HT, Veerkamp JH, Hamilton JA. (2006) Fatty-acid-binding protein from the flight muscle of *Locusta migratoria*: evolutionary variations in fatty acid binding. *Biochemistry* 45(20):6296-305.
- Marcelino AM, Smock RG, Gierasch LM. (2006) Evolutionary coupling of structural and functional sequence information in the intracellular lipid-binding protein family. *Proteins* 63(2):373-84.
- Meenan NA, Ball G, Bromek K, Uhrin D, Cooper A, Kennedy MW, Smith BO. (2011) Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. *PLoS Negl Trop Dis* 5(4):e1040.
- Mei B, Kennedy MW, Beauchamp J, Komuniecki PR, Komuniecki R. (1997) Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 272(15):9933-41.
- Mesgarzadeh A, Pfeiffer S, Engelke J, Lassen D, Rüterjans H. (1998) Bound water in apo and holo bovine heart fatty-acid-binding protein determined by heteronuclear NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 251(3):781-6.
- Michalski ML, Monsey JD, Cistola DP, Weil GJ. (2002) An embryo-associated fatty acid-binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 124(1-2):1-10.
- Myers E, Miller W. (1988) Optimal alignments in linear space. *CABIOS* 4, 11-17.
- Regad L, Martin J, Camproux AC. (2011) Dissecting protein loops with a statistical scalpel suggests a functional implication of some structural motifs. *BMC Bioinformatics* 12:247.
- Sali A, Blundell TL. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3):779-815.
- Scapin G, Gordon JI, Sacchettini JC. (1992) Refinement of the structure of recombinant rat intestinal fatty acid-binding apoprotein at 1.2-Å resolution. *J Biol Chem* 267(6):4253-69.

Smith AJ, Sanders MA, Juhlmann BE, Hertz AV, Bernlohr DA. (2008) Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. *J Biol Chem* 283(48):33536-43.

Stivala A, Wybrow M, Wirth A, Whisstock JC, Stuckey PJ. (2011) Automatic generation of protein structure cartoons with Pro-origami. *Bioinformatics* 27(23):3315-6.

Storch J, Bass NM. (1990) Transfer of fluorescent fatty acids from liver and heart fatty acid-binding proteins to model membranes. *J Biol Chem* 265(14):7827-31.

Storch J, Thumser AE. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1486(1):28-44.

Storch J, McDermott L. (2009) Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res* 50 Suppl:S126-31.

Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, Banaszak L. (1997) The crystal structure of the liver fatty acid-binding protein. A complex with two bound oleates. *J Biol Chem* 272(11):7140-50.

Thompson J, Ory J, Reese-Wagoner A, Banaszak L. (1999) The liver fatty acid binding protein-comparison

of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Mol Cell Biochem* 192(1-2):9-16.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. (2009) Jalview Version 2 -a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25(9):1189-91.

Wharton D. (1980) Nematode egg-shells. *Parasitology* 81(2):447-63.

Wiesner S, Kurian E, Prendergast FG, Halle B. (1999) Water molecules in the binding cavity of intestinal fatty acid binding protein: dynamic characterization by water ^{17}O and ^2H magnetic relaxation dispersion. *J Mol Biol* 286(1):233-46.

Xu Z, Bernlohr DA, Banaszak LJ. (1993) The adipocyte lipid-binding protein at 1.6-Å resolution. Crystal structures of the apoprotein and with bound saturated and unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 268(11):7874-84.

Young AC, Scapin G, Kromminga A, Patel SB, Veerkamp JH, Sacchettini JC. (1994) Structural studies on human muscle fatty acid binding protein at 1.4 Å resolution: binding interactions with three C18 fatty acids. *Structure* 2(6):523-34.

Zimmerman AW, Veerkamp JH. (2002) New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 59(7):1096-116.

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

7. Estudios de Interacción con Ligandos

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

7. Estudios de Interacción con Ligandos

7.1 Introducción

Para lograr un mejor entendimiento de las funciones llevadas a cabo por As-p18 en su entorno natural, se abordaron estudios *in vitro* con proteína recombinante, empleando distintas metodologías. Primeramente, se caracterizaron aquellas moléculas que As-p18 unió selectivamente en el contexto de ligandos endógenos del sistema de expresión. Seguidamente, se muestran estudios de desplazamiento de sondas fluorescentes, ensayando un conjunto de ligandos, a fin de corroborar la información previa y establecer relaciones de preferencia de unión. Mediante las poderosas técnicas de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y Resonancia Magnética Nuclear se pudo constatar la estequiometría del complejo proteína:ligando y evaluar constantes de afinidad. Asimismo, estas técnicas permitieron obtener los parámetros termodinámicos que gobiernan el proceso de unión e indagar sobre los cambios producidos a nivel atómico en la estructura de As-p18 como consecuencia de la formación del complejo As-p18:OLA. Finalmente, se presentan estudios preliminares destinados a analizar el comportamiento de la proteína frente a membranas modelo, evaluando si se produce transferencia de ligandos y cuáles serían los parámetros que modulan su cinética.

7.2 Estudios de Unión a Lípidos Mediante Cromatografía en Capa Fina y Cromatografía Gaseosa.

A fin de evaluar los ligandos que selecciona As-p18 en un entorno celular se realizaron estudios de cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía gaseosa (GC) a partir extractos lipídicos de proteína recombinante. Si bien el citoplasma de *E. coli* no es el entorno propio de As-p18, este enfoque permitió una primera aproximación para establecer los ligandos preferidos en un entorno celular.

Extracción Lipídica de As-p18

Luego de obtener y purificar As-p18 como se describe en el Capítulo 3, pero omitiendo el paso de deslipidización por HPLC, se realizó la extracción lipídica a ~20 mg de proteína resuspendida en 2 mL de PBS. El protocolo de extracción se aplicó de igual manera a proteína deslipidizada (~7 mg de proteína en 5 mL de buffer) y a una muestra

del sonicado bacteriano de origen (~2 mL). Como control de contaminantes lipídicos se procesó en paralelo una muestra de 2 mL de buffer PBS. La extracción se realizó según el protocolo de Folch y col. (1957), modificado por Obal y col. (2012), con pequeñas variaciones. Los volúmenes de muestra mencionados se mezclaron con 10 mL de una mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) y se agitaron vigorosamente por 15 min en baño de hielo. Luego de filtrar, el extracto se lavó con 250 μL de una solución de NaCl (2.92%), se agitó y finalmente se separaron las fases mediante centrifugación a 1000 rpm por 10 min tras lo cual se descartó la fase superior. La fase inferior conteniendo los lípidos se llevó a sequedad mediante corriente de N_2 . Por último los lípidos se resuspendieron en CHCl_3 y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bajo N_2 hasta su uso.

Análisis de Lípidos por TLC

Al igual que otras cromatografías, la TLC consiste de una fase estacionaria y una fase móvil, y el principio de la técnica radica en que las sustancias de interés se adherirán a la fase estacionaria o se moverán con la fase móvil, viajando una distancia que es proporcional a la afinidad por la fase móvil. En este caso, la fase estacionaria empleada fue una capa fina de gel de sílice que se halla sobre una placa de vidrio. La fase móvil se adecuó de acuerdo a la clase de lípidos que se deseaba resolver.

Los extractos lipídicos obtenidos se sembraron manualmente con jeringa Hamilton en dos placas de TLC de Silica Gel Si250 (*J.T.Baker*), de 20 x 20 cm, previamente activadas a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. Se siguieron las condiciones de corrida y se utilizaron las mezclas de solventes detallados por Obal y col. (2012). Para la resolución de lípidos polares se utilizó una fase móvil con la siguiente composición: acetato de metilo/isopropanol/cloroformo/metanol/KCl 0.25% (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v). Para la separación de los lípidos neutros, el sistema de solventes empleado fue: hexano/dietiléter/ácido acético (80:20:1, v/v/v). Las bandas de lípidos se visualizaron por pulverización de las placas con CuSO_4 8% (m/v) en solución acuosa de H_3PO_4 10% (v/v) y posterior carbonización a $140\text{ }^\circ\text{C}$. La identificación de los componentes lipídicos se llevó a cabo mediante la comparación con patrones sembrados en la misma placa. Todo el procedimiento se realizó por duplicado. El análisis por este tipo de cromatografía mostró que la proteína recombinante une de manera exclusiva ácidos grasos (AG), lo cual se evidenció por una única banda en la placa de lípidos neutros a la altura correspondiente del patrón proveniente de un extracto lipídico de homogenato de hígado de rata (Figura 7.1). También pudo comprobarse la efectividad del método de

deslipidización por HPLC ya que el extracto de proteína sometida a este proceso no mostró bandas en ninguna de las dos placas.

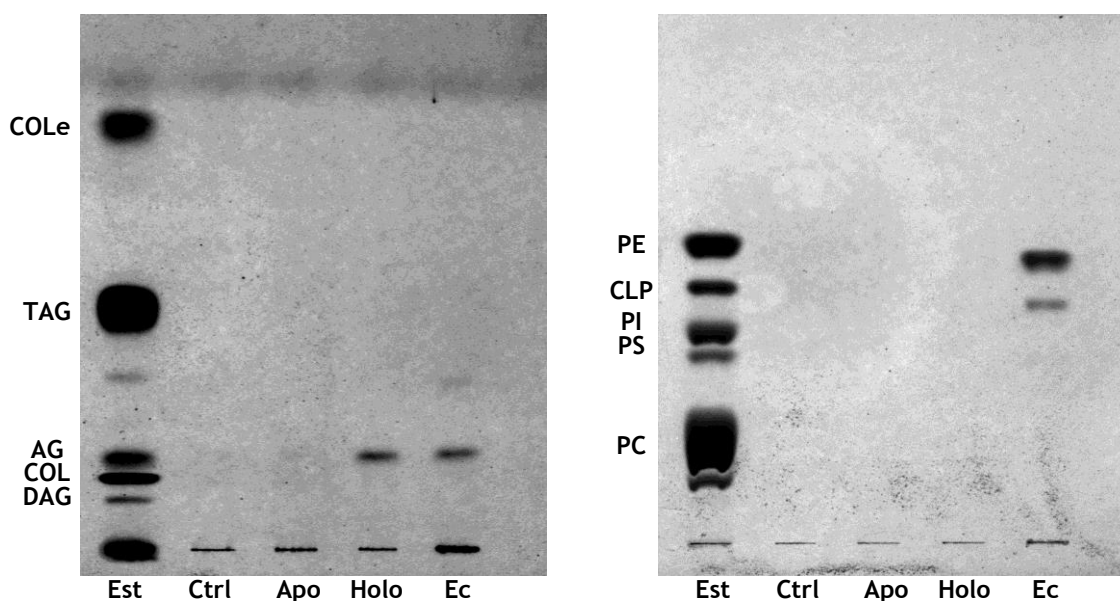


Figura 7.1. Placas de TLC de los extractos de As-p18 y del lisado celular bacteriano. En la placa de la izquierda se resolvieron los lípidos neutros, mientras que en la de la derecha, aquellos de naturaleza polar. Se sembraron secuencialmente: el estándar (Est, lípidos extraídos de homogenato de hígado de rata); el control de solventes y reactivos (Ctrl); el extracto a partir de proteína deslipidizada y no deslipidizada (Apo y Holo, respectivamente); y el extracto a partir del lisado de cultivo de *E. coli* del cual proviene la proteína recombinante (Ec). DAG: diacilglicéridos; COL: colesterol; AG: ácidos grasos; TG: triglicéridos; COLe: ésteres de colesterol; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; CLP: cardiolipina; PE: fosfatidiletanolamina.

Identificación de Ácidos Grasos mediante Cromatografía Gaseosa a partir de los Ésteres Metílicos Correspondientes

Habiendo determinado que As-p18 seleccionaba únicamente a los ácidos grasos dentro de la oferta lipídica presente en la bacteria, resultó interesante investigar la identidad de los AGs y sus proporciones relativas tanto en el extracto de As-p18 como en el medio bacteriano.

Los ácidos grasos presentes en *E. coli* incluyen especies saturadas, monoinsaturadas, β -hidroxiladas y ciclopropanos, con una longitud de C12 a C18 (Marr & Ingraham, 1962). También se ha reportado la síntesis de ácido linolénico (18:3) en este sistema bacteriano (Rabinowitch et al., 1993). La composición relativa de estos AGs varía de acuerdo a la temperatura y velocidad de crecimiento, y la composición de los medios de cultivo (Cronan, 1975). De esto último se desprende la importancia de establecer la preferencia relativa de As-p18 por los distintos AGs, conociendo el contexto de unión. Para ello, los

extractos lipídicos de As-p18 y lisado celular fueron esterificados, siguiendo el protocolo descrito por Morrison y Smith (1964) y los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAGs) analizados por GC de acuerdo a Maté y col. (2004).

Previo al paso de esterificación, se realizó la saponificación de las muestras para liberar los AGs del pool de lípidos acilados presentes en los extractos bacterianos. Para ello, las muestras se trataron con una solución de KOH 10% (p/v) en etanol absoluto por 45 min a 80 °C. Seguidamente, se removió la fracción insaponificable por agitación de la fase alcohólica con 2 mL de éter de petróleo. Acto seguido, se acidificó con HCl fumante a fin de extraer los AG en su forma protonada favoreciendo su partición a un nuevo agregado de éter de petróleo. Para la posterior obtención de los EMAGs los extractos previamente obtenidos se llevaron a sequedad bajo corriente de N₂ y se resuspendieron en 2 mL de BF₃ en MeOH al 10%. Tras gasearlos con N₂, se incubaron durante 1 hora a 64 °C y, por último, se realizó una extracción clorofórmica. Se evaporó a sequedad bajo corriente de N₂ y los EMAGs obtenidos se resuspendieron en un volumen adecuado de n-hexano para su almacenamiento y posterior uso.

El perfil de ácidos grasos se determinó por cromatografía gaseosa. En esta técnica la elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. En particular, la cromatografía gas - líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (Gomis Yagües, 2008). En este trabajo de Tesis se empleó un cromatógrafo gaseoso *Hewlett- Packard HP 6890 A*, equipado con un detector de ionización de llama. El volumen de inyección como la fracción de muestra detectada se adecuó a fin de obtener señales comparables. Los EMAGs se separaron usando una columna capilar *Supelco 11090-02A Omegawax* (30 m de longitud, 0.250 mm de diámetro interno, 0.1 µm de espesor). La composición de ácidos grasos se expresó como porcentaje del total de ácidos grasos a partir del área bajo los picos del cromatograma. Se identificaron los EMAGs proveniente de los ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0), hexadecenoico (16:1), metilhexadecanoico (17:1), esteárico (18:0), octadecenoico (18:1 n-9 y n-7) y β-hidroximirístico. Los mismos se reconocieron por comparación con los tiempos de retención de ácidos grasos de referencia, inyectados como EMAGs, a excepción del β-hidroximirístico y el metilhexadecanoico, para los cuales se recurrió a datos bibliográficos (Marr & Ingraham, 1962).

Ácido Graso	ID	Abundancia Relativa (%)	
		<i>E. coli</i>	As-p18
Mirístico	14:0	2.1	0.0
Palmítico	16:0	41.5	10.7
Hexadecenoico	16:1	12.1	11.3
Metilenhexadecanoico	17:1	5.8	6.4
Esteárico	18:0	2.5	11.9
Octadecenoico	18:1	34.5	57.6
β -hidroximirístico	β -OH 16:0	1.4	2.0

Tabla 7.1. Ácidos Grasos detectados como EMAGs provenientes de extractos de As-p18 y de lisado celular bacteriano.

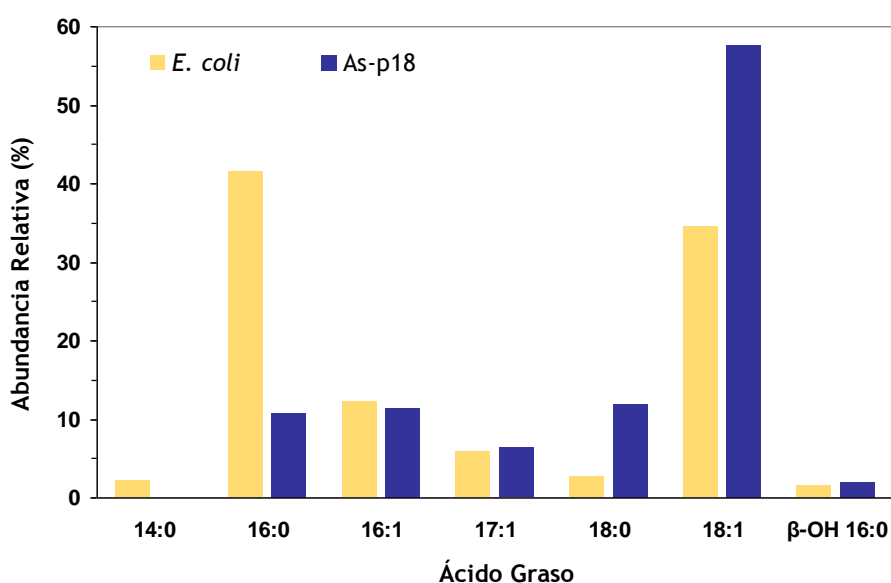


Figura 7.2. Abundancia Relativa de AGs extraídos de As-p18 y del lisado celular bacteriano.

Como se ve en la Figura 7.2, se evidenció que As-p18 era capaz de unir AGs de distinto largo de cadena y grado de insaturación; pero con una marcada afinidad por el 18:1 cuya proporción se ve enriquecida si se lo compara con la cantidad relativa presente en el extracto del lisado bacteriano total. De acuerdo a estudios de lípidos de *E. coli* reportados (Kaneshiro & Marr, 1961), el pico de 18:1 correspondería a una mezcla de ácido oleico (n-9) y vaccénico (n-11). Aunque de manera menos sobresaliente, también se observó un enriquecimiento relativo del ácido graso saturado de misma longitud de cadena carbonada, ácido esteárico (18:0).

7.3 Estudios de Preferencia de Unión mediante Espectroscopía de Fluorescencia.

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia y consiste en un proceso de emisión producido por moléculas que se han excitado mediante absorción de radiación electromagnética. Estas moléculas excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones, en lo que se denomina emisión de fluorescencia. En las muestras biológicas las moléculas fluorescentes (fluoróforos) están normalmente en disolución, pudiendo interaccionar con otras especies, y exhibiendo en consecuencia variaciones en el proceso de emisión (Iglesias Bexiga, 2011). La espectroscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de procesos de unión proteína:ligando gracias a la alta sensibilidad de los fluoróforos a los cambios de su entorno próximo, que son reflejados en sus espectros. Las moléculas de fluoróforo pueden estar presentes tanto en la proteína de estudio (triptofanos, y en menor medida tirosinas y fenilalaninas, que se hallen en posiciones sensibles a la unión del ligando) como así también en ligandos naturales o modificados químicamente a fin de dotarlos de propiedades espectrales adecuadas (éste último es el caso de los análogos de ácidos grasos, DAUDA y AOFAs utilizados en este trabajo). Los cambios que se produzcan en la emisión de fluorescencia a una longitud de onda determinada, pueden emplearse para recabar información sobre la afinidad de la unión.

A fin de caracterizar la preferencia de unión *in vitro* de As-p18 por distintos AGs, se analizó su unión mediante ensayos de desplazamiento con una sonda fluorescente.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro *Fluorolog - 3* (Horiba-Jobin Yvon). Las medidas se hicieron al menos por duplicado a una temperatura de 25 °C y empleando muestras de ~2 mL en una cubeta de cuarzo. Las concentraciones de los ácidos grasos se mantuvieron por debajo de su concentración micelar crítica (CMC) y con un contenido final de etanol menor al 1.5%. Se usaron blancos en buffer PBS para corregir por Raman y dispersión basal. Se empleó como sonda fluorescente al análogo de ácido graso DAUDA (ácido 11-((5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino)undecanoico, *Molecular Probes*) el cual ve alterado su espectro de emisión al unirse a proteínas. Los ácidos grasos ensayados se obtuvieron de Sigma e incluyeron especies saturadas (C10, C11, C12, C13, C14, C16, C17, C18, C19, C20) e insaturadas (C18:1 n-9). Según el protocolo descrito por Prior et al. (2001), se incubó 3 min la proteína con DAUDA y se detectaron los cambios en

los espectros de emisión (λ_{exc} 345 nm) producidos por el agregado de cantidades crecientes de ácidos grasos no fluorescentes. La concentración de As-p18 en cubeta fue de 1.25 μ M y el stock en etanol de DAUDA, se diluyó 1:10000 en PBS para dar una concentración de 1 μ M en los ensayos. Las soluciones de AGs se prepararon 10 mM en etanol y se diluyeron 1:100 en PBS. Se realizaron tres agregados sucesivos de 10 μ L de la diución 1/100. Para el cálculo de la disminución de la fluorescencia se consideraron los cambios en el pico de emisión a 500 nm, teniendo en cuenta el efecto del primer agregado de ligando no fluorescente (concentración final 0.49 μ M).

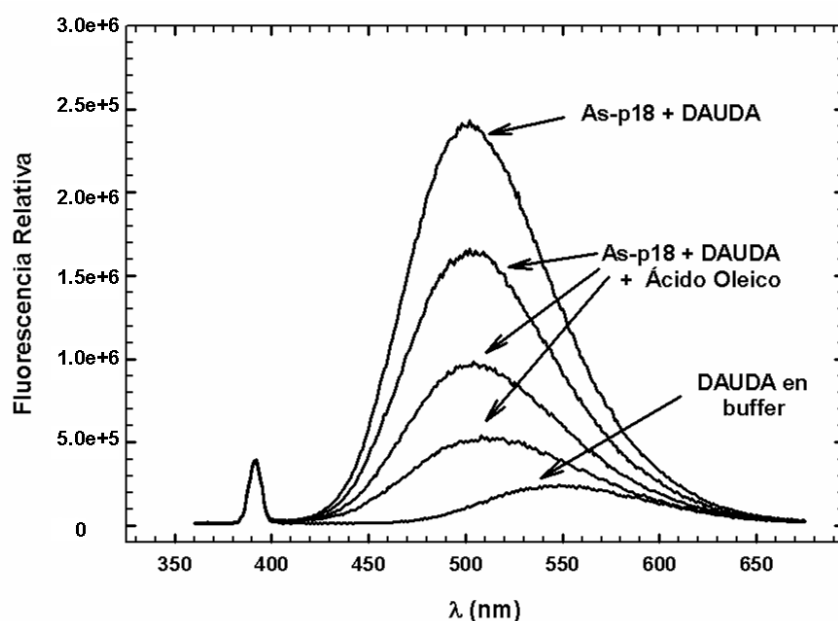


Figura 7.3. Espectros de emisión de fluorescencia modificados por la adición de ácido oleico. Se muestra el espectro de DAUDA en buffer y el aumento de fluorescencia luego del agregado de As-p18. La fluorescencia vuelve a disminuir con los sucesivos agregados de ácido oleico.

Como se ve en la Figura 7.3, la unión de DAUDA a la proteína ocasionó un aumento significativo en la fluorescencia de la sonda, acompañado de un desplazamiento del máximo de emisión hacia el azul (de 550 a 500 nm). Estos cambios reportados por la sonda fluorescente estarían indicando que el sitio de unión en As-p18 posee un carácter hidrofóbico. Tras la adición progresiva de los AGs no fluorescentes, se produjo un desplazamiento competitivo del DAUDA desde el complejo con As-p18, reflejado en la disminución de la fluorescencia. El grado de desplazamiento provocado por los distintos ligandos se relacionó con la afinidad relativa de As-p18 por cada uno de ellos. De esta manera, como se ve en la Figura 7.4, As-p18 presentó una afinidad moderada en el

rango C12 a C19, con una significativa selectividad para el ácido graso insaturado C18:1, oleico.

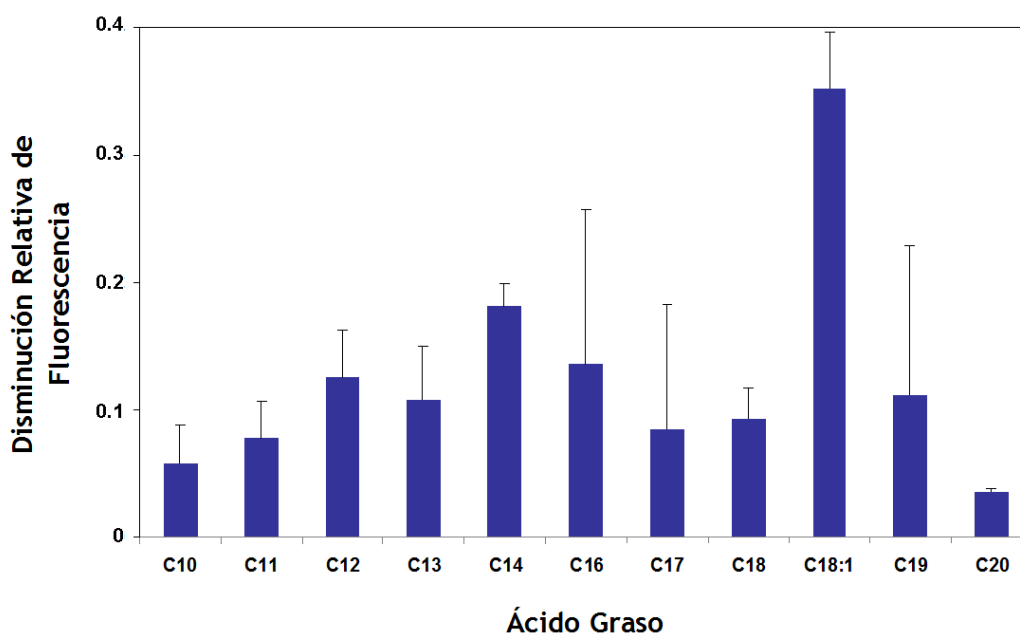


Figura 7.4. Preferencia de unión a AGs evaluada por desplazamiento de DAUDA. Las medidas provienen de ensayos con dos o tres repeticiones.

7.4 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica o ITC es una técnica sencilla y no destructiva que mide de manera directa el calor liberado o absorbido en procesos de interacción intermolecular, como es el caso de las asociaciones proteína-ligando. Los experimentos de ITC consisten en valoraciones calorimétricas de un volumen de uno de los reactivos (normalmente, la proteína) con cantidades controladas del otro reactivo (normalmente, el ligando), a presión y temperatura constantes. En consecuencia, el calor medido directamente durante la titulación corresponde a la entalpía de dicho proceso (Iglesias Bexiga, 2011). La calorimetría de titulación isotérmica permite obtener una caracterización termodinámica completa y precisa del proceso de unión, con la ventaja adicional de que, a diferencia de los métodos ópticos, las medidas calorimétricas no requieren la incorporación de marcas específicas. Así, mediante un único experimento se logra determinar la estequiometría, así como la constante de equilibrio y la energética del proceso (González Flecha, 2013). Respecto a este último aspecto, se destaca la capacidad de discriminar entre las contribuciones entrópicas y entálpicas que

acompañan al proceso de unión, enriqueciendo el análisis del mismo.

Para caracterizar la unión de As-p18 al ácido oleico, se midieron los parámetros termodinámicos mediante procedimientos de ITC estándar, empleando un equipo *MicroCal VP-ITC* (volumen de trabajo 1.4 mL, agitación 320 rpm, 25 °C). Todas las soluciones empleadas se desgasearon antes de su uso (Cooper & Johnson, 1994). El experimento se realizó por duplicado y cada titulación constó de 28 inyecciones sucesivas a intervalos de 4 min, de 10 µL de una solución de ácido oleico (0.325 mM, buffer fosfato 20 mM, pH= 7.6) sobre la celda del equipo conteniendo As-p18 en un buffer de idéntica composición (11.68 µM). A fin de favorecer la solubilidad del ligando, los buffers se prepararon con metil-β-ciclodextrina (MβCD, 2%). Como experimento de control se realizó la misma operación sobre una celda conteniendo solo buffer (para evaluar calores de dilución) y sobre As-p18 no deslipidizada (para examinar diferencias en la interacción). Los datos de titulación se corrigieron por los calores de dilución y se analizaron utilizando un modelo de unión de equilibrio con sitio único (*MicroCal Origin*) para dar la estequiometría aparente de unión (N), las constantes de asociación/disociación ($K_A = 1/K_D$) y la entalpía de unión (ΔH).

Como se ve en la Figura 7.5, el modelo de ecuaciones que describe el proceso (línea roja) se ajustó satisfactoriamente a la representación gráfica del calor intercambiado en cada inyección por mol de ligando, en función de la relación molar ligando/As-p18. La estequiometría determinada de 0.9 se correlaciona con la evidencia acumulada a nivel estructural y reportada por otros autores (Mei et al., 1997). La afinidad de unión, representada por una K_D de 3.1 ± 0.2 µM, es comparable a la que exhibe AFABP por el mismo ligando (2.4 ± 0.1 µM) (LaLonde et al., 1994). Sin embargo, las comparaciones entre valores de K_D , aún determinadas por el mismo método, pueden no ser del todo confiables ya que hay una fuerte dependencia vinculada a la concentración real de ligando y a cómo se haya preparado la solución de trabajo. Debido a la escasa solubilidad de los ligandos lipídicos, si no se toman las precauciones adecuadas, pueden cometerse errores por defecto en la determinación de la concentración disponible en solución de los ácidos grasos (Richieri et al., 2000). Esto podría explicar las diferencias en órdenes de magnitud encontradas en constantes de afinidad para distintas FABPs determinadas por ITC que no encuentran correlato relativo, con las K_D determinadas por otros métodos como ADIFAB y Lipidex (Maatman et al., 1994; LaLonde et al., 1994; Balendiran et al., 2000; Lücke et al., 2003). Más allá de los valores de K_D que indican que el proceso de unión es favorable desde el punto de vista de la energía libre

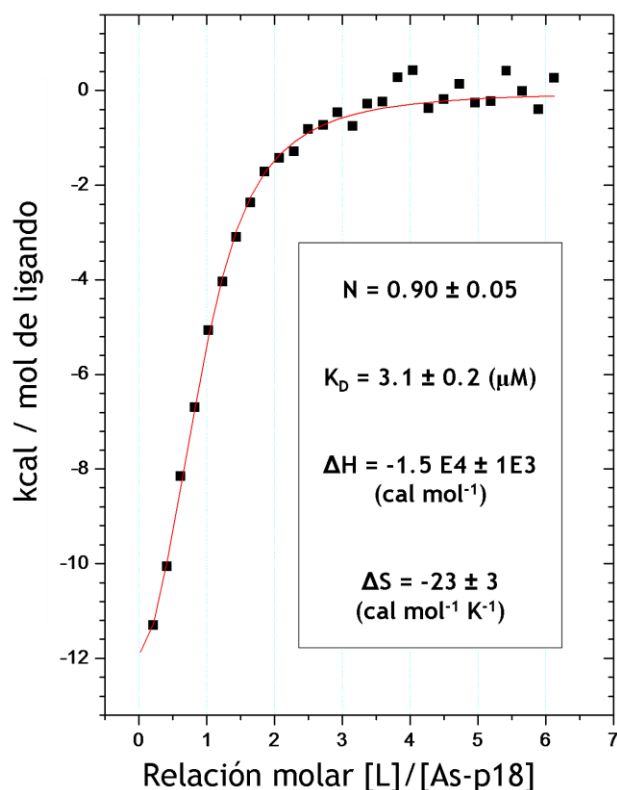


Figura 7.5. Calorimetría de Titulación Isotérmica de unión del ácido oleico a As-p18. Se muestra los valores de calor integrados para cada agregado en función de la relación molar ligando:proteína. La curva en rojo indica el ajuste del modelo de unión a los datos. En el recuadro se detallan los parámetros promedio de dos repeticiones.

de Gibbs, es interesante analizar la llamada marca termodinámica (González Flecha, 2013). El análisis de la marca termodinámica básica permite la disección de la afinidad en sus contribuciones entálpicas y entrópicas. La interacción As-p18–ácido oleico mostró estar gobernada por una fuerte contribución entálpica (-15 kcal/mol) que compensó el efecto desfavorable en el término entrópico ($-T\Delta S = 7$ kcal/mol).

Tal como detalla LaLonde et al. (1994) para AFABP, los factores entálpicos y entrópicos medidos macroscópicamente son valores netos y están compuestos por múltiples componentes microscópicos, tanto positivos como negativos. Si bien no es posible relacionar de manera cuantitativa los datos termodinámicos y los eventuales eventos a nivel estructural, sí puede plantearse una interpretación cualitativa la cual se resume en la Tabla 7.2.

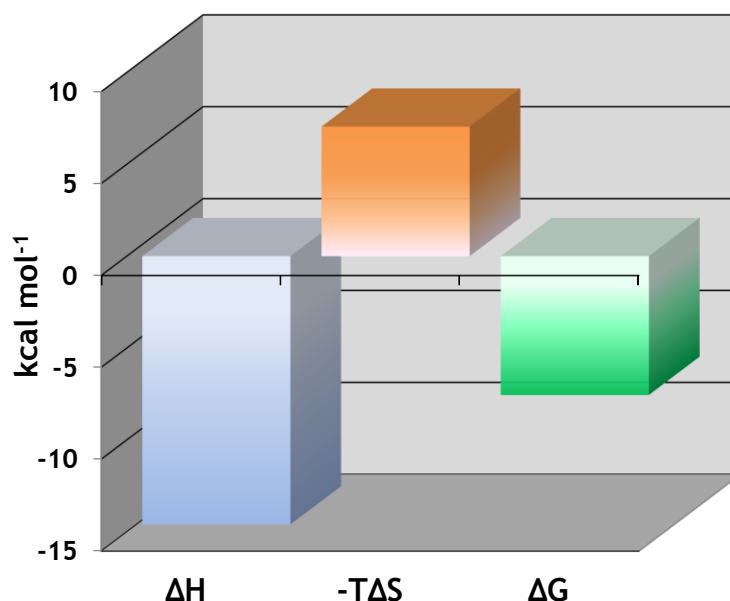


Figura 7.6. Marca termodinámica en la interacción entre el ácido oleico y As-p18. El proceso es impulsado entálpicamente compensando la disminución de entropía conformacional ($\Delta G = -7.6$ kcal/mol; $\Delta H = -14.6$ kcal/mol; $-T\Delta S = 7$ kcal/mol).

El efecto favorable de disminución de entalpía suele asociarse a la formación de interacciones no-covalentes entre moléculas biológicas. De esta manera, la contribución entálpica al proceso de unión ácido oleico–As-p18 puede atribuirse a la estabilización del grupo carboxilato mediante interacciones del tipo electrostático con los grupos ionizables de las cadenas laterales 43Lys y 138Arg que forman parte de la cavidad proteica. Adicionalmente contribuiría, la formación de puente de hidrógeno con 140Tyr. Estas suposiciones basadas en el análisis de la estructura de As-p18 son consistentes con estudios de mutagénesis en AFABP donde se concluye que la interacción del carboxilato del ligando con cadenas laterales de residuos homólogos son componentes claves para el proceso de unión (Sha et al., 1993). En cuanto a la entropía del sistema, ésta comprende diversos factores. Por un lado tras la unión proteína ligando, habría un aumento de la entropía al liberarse moléculas de agua cuyo movimiento se hallaba restringido por las interacciones con la proteína y la solvatación del ligando. Sin embargo, la contribución global desfavorable del término $T\Delta S$ podría deberse al mayor peso que reviste la reducción en el número de conformaciones del ligando libre y de As-p18 desde su forma apo. Si bien estas explicaciones son de carácter especulativo, podría vincularse la presunta disminución de entropía conformacional con los hallazgos presentados en el Capítulo 5, donde se prevé que la estructura de apo As-p18 presentaría

una flexibilidad incrementada en la región portal que es estabilizada por la unión al ligando.

Componentes Entálpicos

Factores a favor

1. Interacciones Coulombicas entre el carboxilato del ligando y 43Lys y 138Arg.
2. Eliminación de interacciones Coulombicas desfavorables entre 43Lys y 138Arg en apoAs-p18.
3. Puente de Hidrógeno entre 140Tyr y el carboxilato del ligando.
4. Puente de Hidrógeno entre electrones π del ligando y átomos de cadenas laterales.

Factores a favor o en contra

5. Fuerzas de dispersión entre ligando y proteína, o entre ligando y red de agua preexistente.
6. Cambios en las interacciones electrostáticas de la proteína como resultado de cambios en la cavidad tras la unión del ligando.
7. Fuerzas de dispersión entre átomos del ligando en la forma libre y unida.

Componentes Entrópicos

Factores a favor

8. Pérdida de agua desde la cavidad.
9. Disminución del orden del solvente cuando el ácido graso se retira del equilibrio en agua.

Factores en contra

10. Pérdida de grados de libertad por el ligando.
11. Pérdida de grados de libertad por las cadenas laterales de la proteína como consecuencia de la unión al ligando.

Tabla 7.2. Factores estructurales relacionados a la termodinámica de la unión a ácido oleico por As-p18.

7.5 Estudios de Interacción mediante RMN

La versatilidad de la espectroscopía de RMN brinda diversas estrategias para el estudio de la interacción proteína–ligando a nivel atómico (Pellecchia et al., 2008). Uno de los enfoques conceptualmente más sencillos se conoce como perturbación de desplazamientos químicos (CSP). Este método consiste básicamente en monitorear, generalmente mediante experimentos de heterocorrelación bidimensional, los cambios producidos en las resonancias de la proteína como consecuencia de la unión a ligandos. (Rodríguez Mías, 2006). En el análisis por CSP se monitorean los desplazamientos químicos, los cuales son extremadamente sensibles a cambios en el entorno próximo como los que ocurren tras la formación de un complejo proteína–ligando. Adquiriendo espectros ^{15}N -HSQC durante una titulación con ligando, se pueden seguir las perturbaciones en los desplazamientos químicos de las amidas de cadena principal y recabar información sobre la afinidad del proceso, además de estimar un mapeo de los

residuos afectados por el proceso de unión.

Respecto a la afinidad de la proteína por el ligando, se puede caracterizar si el complejo proteína–ligando formado se encuentra bajo un intercambio lento o rápido en la escala de tiempo de RMN (Kleckner & Foster, 2011). En una aproximación general se puede considerar que las uniones de alta afinidad (con constante de disociación $K_D < 3 \mu\text{M}$) presentarán un intercambio lento en la escala de tiempo de RMN: es decir que la constante de intercambio, K_{ex} es menor que la diferencia de desplazamientos químicos entre las formas de proteína libre y asociada ($|\omega_{\text{Apo}} - \omega_{\text{Holo}}|$). En consecuencia, en un experimento pueden detectarse las dos poblaciones con sus señales y desplazamientos químicos independientes. En el curso de una titulación, la señal de la proteína libre decrece a medida que una nueva señal aparece en la posición del estado asociado que incrementa su intensidad hasta convertirse en la única señal observable cuando se alcanza el punto de saturación (Goldfalm et al., 2012). Por el contrario en un evento de unión de baja afinidad, con constante de disociación $K_D > 3 \mu\text{M}$ (Williamson, 2013), el intercambio entre las dos poblaciones, asociada y libre, describe una K_{ex} mayor a la diferencia de los corrimientos químicos ($K_{\text{ex}} \gg |\Delta\omega|$). Por lo tanto, en los espectros se evidencia un único juego de señales resonando en una posición de acuerdo a la relación entre las especies proteína unida y libre (Figura 7.7). De esta manera, los valores de

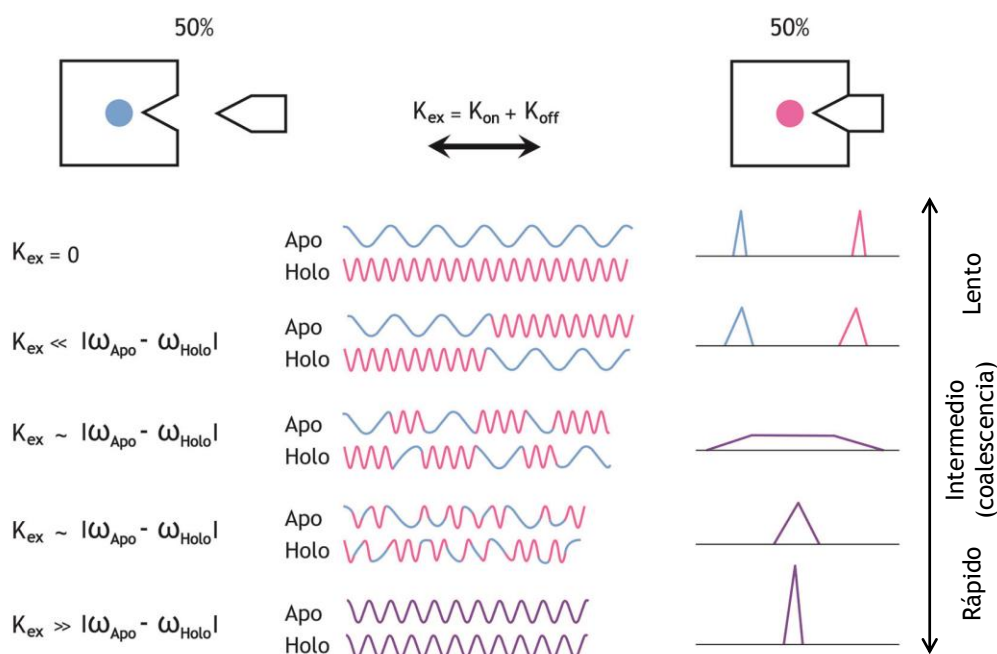


Figura 7.7. Regímenes de intercambio proteína ligando observados por RMN. De acuerdo a la relación entre la constante de intercambio, K_{ex} , y la diferencia de desplazamientos químicos, $|\omega_{\text{Apo}} - \omega_{\text{Holo}}|$, se establecen tres regímenes de intercambio denominados lento ($K_{\text{ex}} \ll |\Delta\omega|$), intermedio ($K_{\text{ex}} \sim |\Delta\omega|$) y rápido ($K_{\text{ex}} \gg |\Delta\omega|$).

corrimiento químico se mueven desde la forma libre a la unida, a la que llega cuando la muestra se satura de ligando.

Para el estudio de interacción entre As-p18 y el ácido oleico por RMN se monitorearon los cambios producidos en espectros ^{15}N -HSQC, tras los sucesivos agregados de ligando. En base a la experiencia reportada por He et al. (2011) se preparó una solución stock de oleato de sodio 100 mM en agua y se realizaron tres agregados sucesivos de 1.67 μL sobre una muestra de $[^{15}\text{N}]\text{As-p18}$ 389 μM para obtener información espectral de las relaciones proteína:ligando, 1:0; 1:0.5; 1:1; 1:1.5. Para evaluar las perturbaciones provocadas en las resonancias amida se calculó el índice de CSP con la fórmula:

$$\Delta\delta_{NH} = \sqrt{\frac{\Delta\delta_H^2 + 0.2 \Delta\delta_N^2}{2}} \quad (7.1)$$

en donde el factor de escala en el desplazamiento químico del nitrógeno de 0.2, se adecuó de acuerdo a la relación entre los rangos de frecuencias de los núcleos involucrados (Williamson, 2013). Se establecieron dos umbrales para caracterizar a los CSP. Aquellos que diferían del valor de CSP promedio en una cantidad mayor a dos veces la desviación estándar se consideraron como ampliamente perturbados; mientras que los que lo hacían en más de una pero menos de dos desviaciones estándar, como moderadamente perturbados. Para evitar un sesgo en la distribución, se calculó la “correcta” desviación estándar, σ_0 , según Schumann et al. (2007).

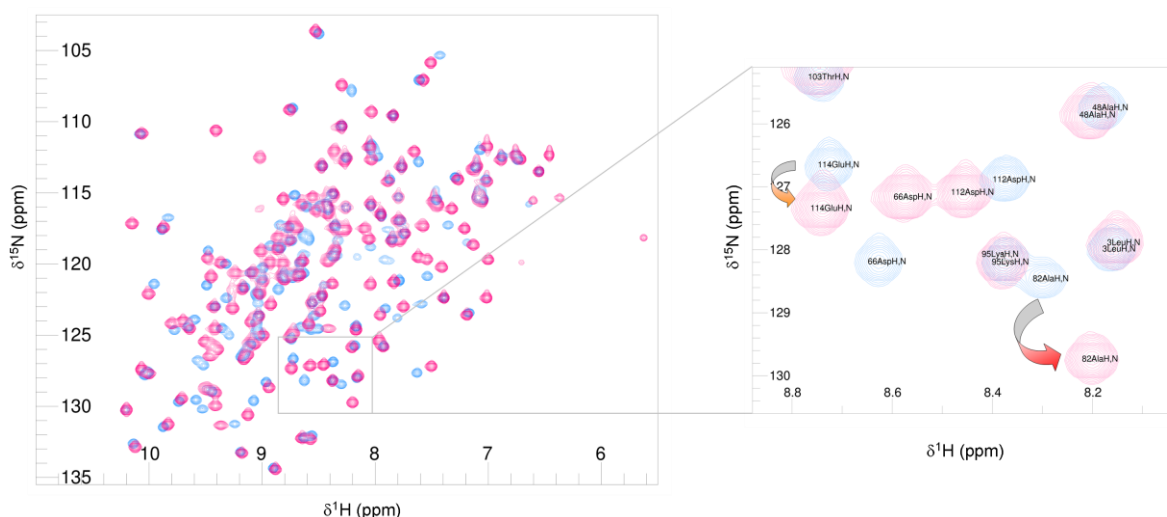


Figura 7.8. Espectros ^{15}N -HSQC superpuestos de As-p18 con y sin ligando. Se muestran los picos de la forma apo (azul) y holo correspondiente a una relación proteína:ligando de 1:1.5 (rosa). En el *inset* se amplía una región del espectro donde se aprecian residuos con desplazamientos químicos perturbados de manera considerable, moderada o escasa (flecha roja, flecha naranja y picos superpuestos, respectivamente).

La inspección de los espectros adquiridos en los distintos puntos de la titulación, permitieron comprobar indudablemente que As-p18 presenta un único sitio de unión para la molécula de oleato. Dadas las características de los picos observados que denotaron un fenómeno de intercambio lento, se infirió un $K_D < 3 \mu\text{M}$ (Williamson, 2013). Como se muestra en la Figura 7.8 se observaron cambios en los desplazamientos químicos para un número considerable de residuos. Simultáneamente se registró la aparición de nuevas señales pertenecientes a amidas peptídicas, invisibles en la forma apo de As-p18.

La distribución de los valores de CSP a lo largo de la secuencia de As-p18 presentada en la Figura 7.9, indica que los residuos mayormente perturbados se localizan en zonas discretas de la estructura de la proteína. Teniendo en cuenta el origen de la perturbación durante el proceso de unión al ligando pueden distinguirse dos grupos de residuos: aquellos perturbados directamente por la unión al ligando, los que estarían integrando el sitio de unión; y aquellos que sufren un cambio en los valores de corrimiento químico como consecuencia de cambios conformacionales propagados a través de la estructura, sin necesariamente intervenir en la estabilización del ligando. Para distinguir inequívocamente entre estos dos grupos fue indispensable contar con la estructura resuelta de As-p18 en su forma holo. Considerando el análisis de las interacciones entre

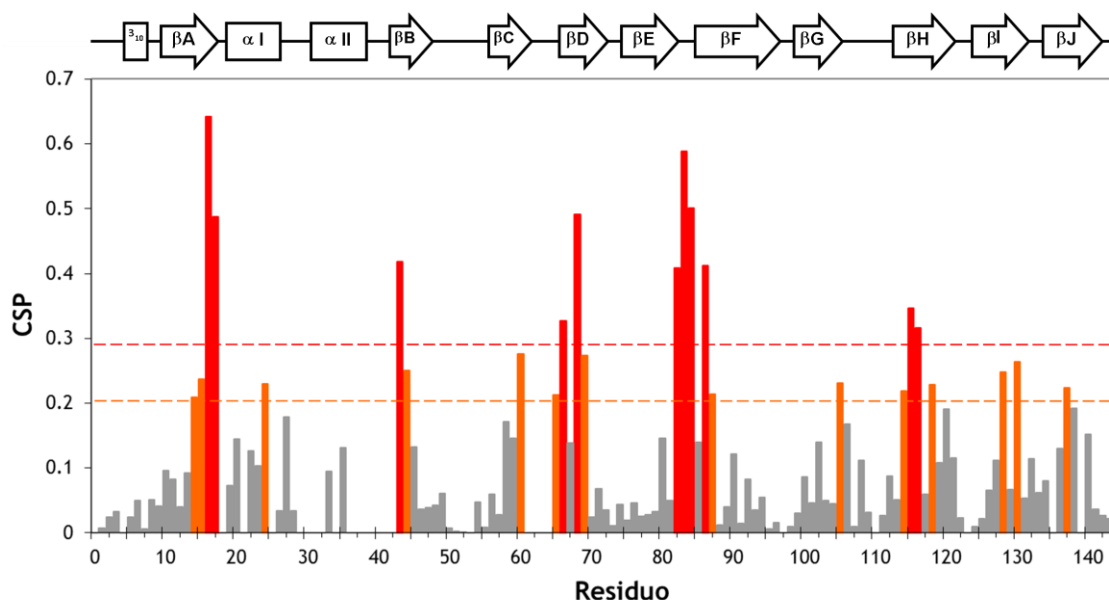


Figura 7.9. Histograma de los CSP inducidos en las amidas peptídicas de As-p18 por la unión a oleato. Las líneas punteadas horizontales de color rojo y naranja indican los dos puntos de corte (CSP promedio más dos desviaciones estándar y más una, respectivamente). En la parte superior de la figura se indican los elementos de estructura secundaria a lo largo de la secuencia de As-p18.

As-p18 y la molécula de oleato presentados en la Tabla 6.2 del Capítulo 6, se observó que muchos de los residuos con altos valores de CSP correspondían al sitio de unión del ligando o a residuos adyacentes que percibían modificaciones en su entorno a través de enlaces. Por otra parte, y evocando la figura 5.7 del Capítulo 5 sobre dinámica, se encontró que para muchos de los residuos que experimentaron grandes perturbaciones durante la titulación, lo mismo que para aquellos que se volvían visibles únicamente en el estado holo de la proteína, podía relacionarse el comportamiento exhibido con un cambio conformacional producido durante la unión al ligando. La conexión entre la hoja βA y αI , la hélice αII en su parte más distal, como su conexión con la hoja βB y los segmentos entre las hojas βC - βD y βE - βF , presentaron los cambios más notorios durante el proceso de unión. Estos resultados corroboran la “hipótesis de la región portal”, previamente comentada ya que se asemejan a los obtenidos por Hodsdon y Cistola (1997^{a/b}) para IFABP, donde mediante técnicas de dinámica en RMN establecen, particularmente para las regiones mencionadas, un estado desordenado en la forma apo, y otro de mayor organización para la forma holo. La Figura 7.10 muestra la localización en la estructura de los residuos cuyas amidas perciben cambios notorios en su ambiente y aquellos cuyas señales amidas se vuelven visibles en la forma holo. Finalmente para las amidas peptídicas de los residuos 68His y 69His pudo ofrecerse una

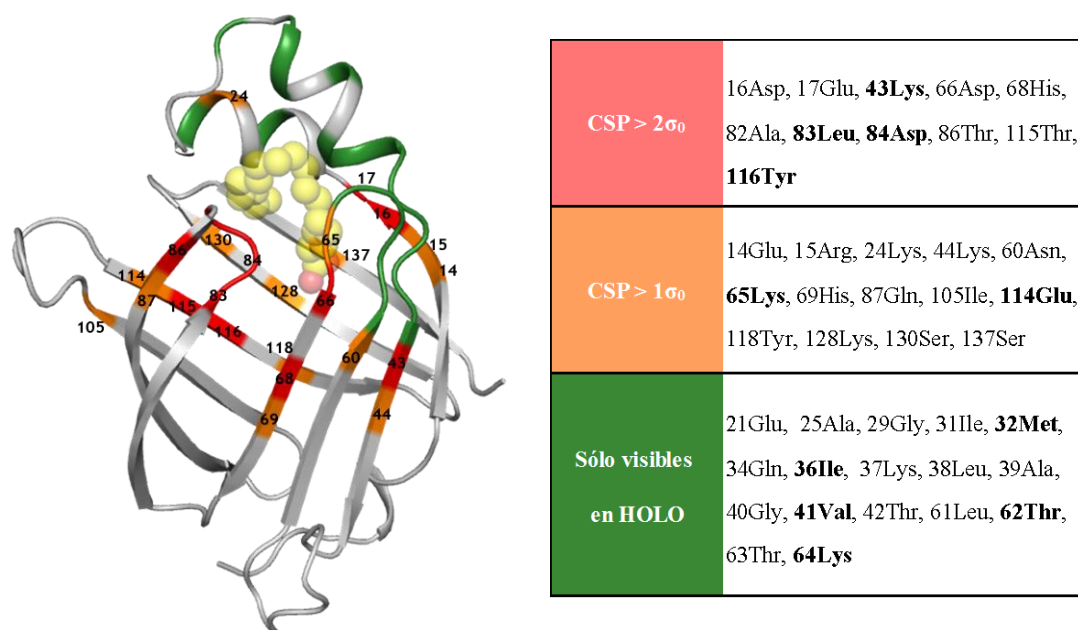


Figura 7.10. Representación de cintas de As-p18 resaltando los residuos con CSP >1σ₀ (naranja) ó >2σ₀ (rojo) y aquellos visibles solo en la forma holo (verde). En la tabla de la derecha se listan los residuos resaltados. En negrita aquellos que se encuentran interactuando con el ligando de acuerdo a la estructura por RMN.

explicación alternativa. Como se comentó en el Capítulo 6, la cadena lateral de 69His que se orienta hacia el interior de la cavidad, si bien no participa directamente en la interacción con el ligando, sí se encuentra involucrada en la formación de la red de interacciones que estabilizan el *core* de la proteína. El hecho de que 69HisN δ_1 H δ_1 (involucrado en un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo 80Asp), sea sólo visible en los espectros de proteína en forma holo, pareciera indicar que en la forma apo, el protón H δ_1 se está intercambiando rápidamente con el solvente y tras la unión del ligando es capaz de establecer la interacción con 80Asp y de esta manera su intercambio se ralentiza. Todos estos cambios producirían un efecto en el desplazamiento químico del NH peptídico de 69His. Para 68His, cuya cadena lateral se orienta hacia el exterior, se detectó que la posición del pico NH en el espectro ^{15}N -HSQC variaba en las distintas muestras utilizadas a lo largo del trabajo de Tesis. Este comportamiento, exclusivo para este residuo, está asociado a una particular sensibilidad a cambios, incluso muy sutiles, en el buffer de resuspensión. A su vez, esta peculiar sensibilidad puede explicarse teniendo en cuenta la ubicación de este residuo en la hebra β -D. Dado que integra parte del *gap* β D- β E, el grupo NH de 68His no participa de puentes de hidrógeno intermoleculares. Esto determina que pueda intercambiar con el solvente con notable facilidad volviéndolo más susceptible al pH y fuerza iónica del medio. Asimismo, al ubicarse en la porción de hebra no apareada de la estructura, también es probable que forme parte del plegamiento que puede cambiar entre las conformaciones unida y libre, con la posición de las moléculas de agua que solvatan este HN muy propensas a ser afectadas (Zanotti et al., 1994).

7.6 Estudios Preliminares de Transferencia de Ligandos a Membranas Modelos

Aún cuando las funciones específicas de las diversas FABPs no han sido completamente dilucidadas, su asociación con el transporte lipídico es evidente. Para llevar a cabo dicha función, se postula que las FABPs deben interaccionar con membranas u otras proteínas con la finalidad de transferir su carga. Consecuentemente, la interacción de las FABPs con membranas modelo ha sido objeto de numerosos estudios (Storch & McDermott, 2009). Con la intención de analizar desde un punto de vista cuantitativo y mecanístico la transferencia de ligandos desde estas proteínas a membranas se han diseñado una serie de experimentos empleando ensayos de

transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) (Kim & Storch 1992^{a/b}; Wootan, et al., 1993). En estos estudios se examina la velocidad de transferencia de antroiloxi-derivados fluorescentes de ácidos grasos (AOFAs) desde la proteína hacia membranas modelo aceptoras, las cuales contienen fosfolípidos unidos a un *quencher* de la fluorescencia del AOFA, (Storch & Thumser, 2000). Si bien evidentemente existen diferencias con los ácidos grasos naturales, el uso de AOFAs se haya ampliamente documentado (Storch et al., 1989; Storch & Bass, 1990; Wootan et al., 1990; Kim & Storch, 1992^{a/b}; Storch, 1993; Wootan et al., 1993; Córscico et al., 1998; Thumser & Storch, 2000; Córscico et al., 2004; Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008 Pórfido et al., 2012). Sus propiedades físico-químicas en cuanto al comportamiento de partición y transferencia en estudios de metabolismo intracelular indican que constituyen sondas confiables (Morand et al., 1982; Collins et al., 1990); y por otro lado, es importante destacar que dada la rápida naturaleza con que sucede la transferencia de AGs desde FABPs a membranas, sería muy difícil monitorear la transferencia de AGs nativos con las técnicas actuales (Storch & McDermott, 2009).

Los estudios de carácter preliminar que se presentan a continuación emplean a los AOFA, 16AP (ácido 16-(9-anthroiloxi) palmítico) y 12AO (ácido 12-(9-anthroiloxi) oleico). Primeramente se determinó la constante de afinidad de As-p18 para uno de estos compuestos. Una vez determinado el K_D , se emplearon ensayos de FRET en el equilibrio para determinar la constante de partición (K_P) del AOFA entre proteína y membrana. Los valores de K_D y K_P se emplearon para establecer las condiciones de los ensayos de cinética de transferencia del ligando, como se detalla más adelante. Estos ensayos se realizan empleando un módulo de mezclado rápido (*stopped-flow*) asociado al espectrofluorómetro, y son de gran utilidad para determinar, *in vitro* y de manera controlada, las variables que gobiernan el proceso de interacción entre proteína y membranas que tiene lugar durante la transferencia del ligando (Storch & Thumser, 2000). En este caso, se inició la puesta a punto de los ensayos que evalúan los efectos de la concentración de vesículas y fuerza iónica del medio sobre la velocidad de transferencia.

Cálculo de la Constante de Afinidad

La constante de afinidad, K_D , se calculó mediante titulación fluorimétrica del ligando fluorescente 16AP según Xu et al. (1991). En esta técnica se monitorea el incremento de la fluorescencia del 16AP como consecuencia del agregado de cantidades crecientes de

proteína. El incremento en la señal fluorescente se atribuye a la relocalización del 16AP desde el solvente al sitio de unión en la proteína. La concentración del 16AP se determinó por absorbancia, usando su coeficiente $\epsilon_{361\text{nm}}=8200 \text{ M}^{-1}$ en etanol absoluto. Se preparó una dilución $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ del ligando en buffer TBS, en una cubeta de cuarzo (volumen de trabajo: 2 mL). Se añadieron cantidades crecientes de la proteína en un rango de 0 a $3 \text{ }\mu\text{M}$, incubando 3 minutos luego de cada agregado. Las medidas se realizaron a una temperatura de 25°C , excitando a 383 nm y midiendo espectros de emisión entre 400 - 550 nm . Se realizó la determinación por triplicado, analizando los datos de acuerdo al método de ajuste no lineal, según la ecuación cuadrática para un único sitio descripta por Miller et al. (1983):

$$PL = \frac{(P_0 + L_0 + K_D) - \sqrt{(P_0 + L_0 + K_D)^2 - 4P_0L_0}}{2} \quad (7.2)$$

siendo PL , P_0 y L_0 las concentraciones del complejo, proteína total y ligando total, respectivamente. La señal de fluorescencia en el equilibrio se interpretó como:

$$F = F_P(P_0 - PL) + F_{PL}PL + F_L(L_0 - PL) \quad (7.3)$$

donde F_P representa la fluorescencia de la proteína libre, F_{PL} representa la fluorescencia del complejo, y F_L , la del ligando libre. El ajuste se logró empleando el módulo *Solver* del *Excel MS Office*, que minimiza el error cuadrático medio entre los datos experimentales y los provenientes de la curva modelo.

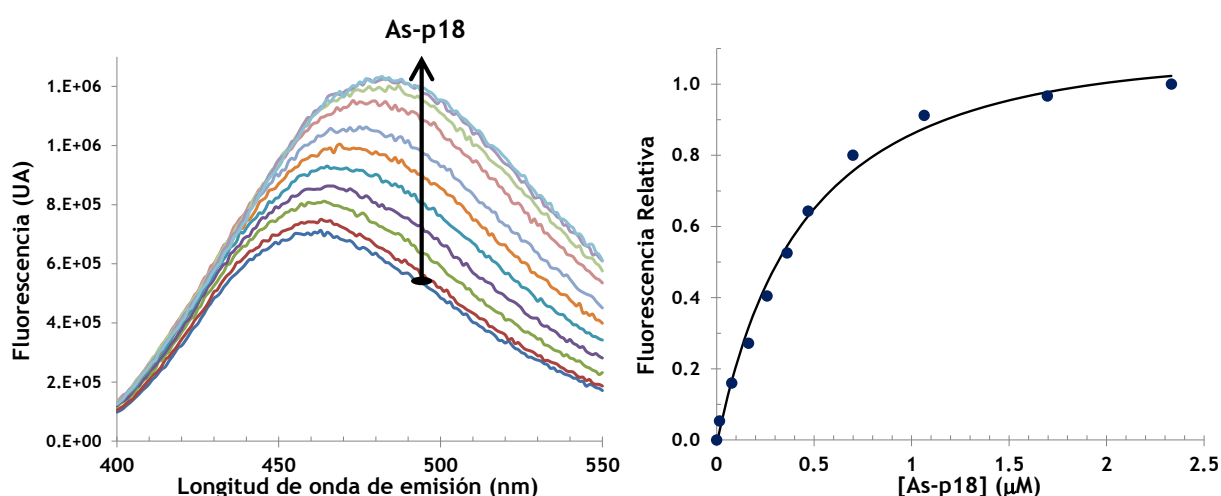


Figura 7.11. Titulación del ligando fluorescente 16AP con As-p18 seguida mediante espectroscopía de fluorescencia. En el panel izquierdo se muestran los espectros de emisión tomados tras la adición de proteína sobre el 16AP (corregidos por blanco). En el panel derecho se grafica la intensidad de fluorescencia relativa a 484 nm en función de $[\text{As-p18}]$ (círculos azules). La línea continua representa el ajuste según el modelo de unión.

En la Figura 7.11 se muestra un ensayo representativo de titulación fluorimétrica, donde se aprecia el aumento de la intensidad de fluorescencia con los sucesivos agregados de proteína hasta saturar al AOFA presente en la cubeta. En el panel derecho se muestra el ajuste que permitió estimar la afinidad por este ligando. El valor de K_D obtenido considerando las tres medidas fue de $0.64 \pm 0.03 \mu\text{M}$, guardando relación con los reportados para otros complejos AOFA-FABP (Storch et al., 1989; Xu et al., 1991; De Gerónimo, 2011)

Cálculo del Coeficiente de Partición

Habiendo establecido la afinidad con que As-p18 liga un antroiloxi derivado de AG, se procedió a determinar el coeficiente de partición para el 16AP y el 12AO. Mediante ensayos *in vitro* de FRET se recabó información acerca de la afinidad relativa de estos ligandos hidrofóbicos por As-p18 y una membrana fosfolipídica artificial, unilaminar, de tamaño pequeño (SUV). Las SUVs empleadas se prepararon de acuerdo a Huang & Thomson (1974) y Storch & Kleinfeld (1986). Las mismas son de naturaleza zwitteriónica, conteniendo 90 mol % fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 10 mol % 1-oleoil-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil}-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (NBD-PC; *Avanti Polar Lipids*), como *quencher* de la fluorescencia de los antroiloxi derivados. Para determinar su concentración se realizó una cuantificación de fósforo inorgánico según la técnica de Gomori (1942). La preparación y cuantificación de las SUVs se describe detalladamente en el Apéndice H.

Siguiendo la técnica descrita por Massey et al. (1997), se registraron los cambios en la fluorescencia del AOFA luego del agregado de SUVs compuestas por EPC más el *quencher* de fluorescencia NBD-PC, a una solución previamente incubada de As-p18 y ligando fluorescente en una proporción proteína:ligando de $\sim 5:0.5 \mu\text{M}$ en buffer TBS. Las medidas de fluorescencia se realizaron a 25°C , excitando a 383 nm y registrando los espectros de emisión entre 400 y 550 nm. La afinidad relativa quedó reflejada en el coeficiente de partición K_P , el cual se define como:

$$K_P = \frac{[\text{AOFA}]_{\text{As-p18}}}{[\text{As-p18}]} \times \frac{[\text{SUV}]}{[\text{AOFA}]_{\text{SUV}}} \quad (7.4)$$

donde $[\text{AOFA}]_{\text{As-p18}}$ y $[\text{AOFA}]_{\text{SUV}}$ representan las concentraciones del ligando fluorescente unido a la proteína y unido a las vesículas, respectivamente. La

transferencia del AOFA a las vesículas con NBD-PC determina una disminución de la fluorescencia inicial del complejo As-p18•AOFA que puede ajustarse a la siguiente ecuación:

$$F_{rel} = \frac{a \times K_p}{K_p + \frac{[SUV]}{[As \cdot p18]}} + b \times \frac{[SUV]}{[As \cdot p18]} \quad (7.5)$$

siendo F_{rel} la fluorescencia (a 478 nm y 486 nm para 16AP y 12AO, respectivamente) del AOFA complejoado con la proteína, relativa al punto inicial de la titulación con SUVs; y a y b , parámetros de ajuste (De Gerónimo et al., 2010). Las medidas se realizaron por duplicado para cada AOFA, y las respectivas K_p se calcularon empleando el módulo *Solver* del *Excel MS Office*, que minimiza el error cuadrático medio entre los datos experimentales y los provenientes de la curva modelo.

En la Figura 7.12 se muestra un ensayo representativo de la titulación del complejo As-p18•16AP preformado, con cantidades crecientes de EPC-SUV conteniendo el *quencher* NBD-PC, y el ajuste correspondiente para el cálculo del K_p . Se puede apreciar en el panel izquierdo de la figura, como la fluorescencia correspondiente al complejo ligando•proteína disminuye, al tiempo que se incrementa la fluorescencia del par FRET presente en las SUVs.

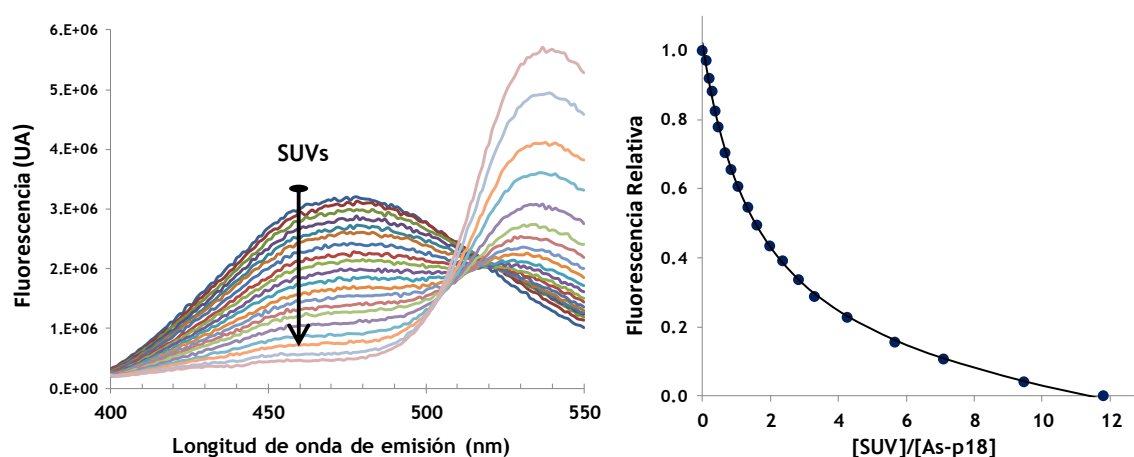


Figura 7.12. Determinación de la constante de partición del 16AP entre la proteína As-p18 y las SUVs de EPC-NBD. En el panel izquierdo se muestran los espectros de emisión tomados tras la adición de cantidades crecientes de SUVs conteniendo al aceptor FRET del grupo antroiloxi, sobre el complejo As-p18•16AP (corregidos por blanco). En el panel derecho se grafica la intensidad de fluorescencia relativa a 478 nm en función del cociente $[SUV]/[As-p18]$ (círculos azules). La línea continua representa el ajuste de la Ecuación 7.5 a los datos experimentales.

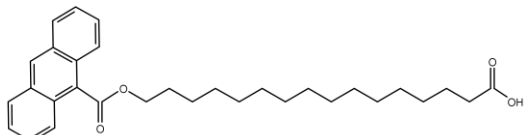
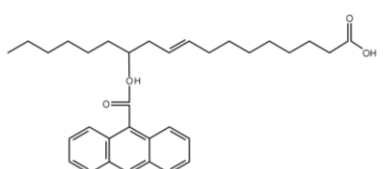
AOFA	K_P
<p>16AP</p> 	2.1 ± 0.7
<p>12AO</p> 	2.0 ± 0.4

Tabla 7.3. Coeficientes de partición para derivados fluorescentes de ácidos grasos. Los valores de K_P reflejan la distribución relativa de los ligando hidrofóbicos en la proteína As-p18 y las SUVs.

En la tabla 7.3 se presentan los valores de K_P que resultaron muy similares para ambos AOFA, indicando una leve preferencia de partición del ligando hacia la proteína respecto de las membranas fosfolipídicas zwitteriónicas. En la literatura, este valor encuentra correspondencia con el determinado para el 12AO en relación a una FABP miembro de la subfamilia IV, HFABP. En condiciones de ensayos semejantes, este análogo fluorescente se distribuye en una relación 2:1 cuando se lo incubaba con HFABP y se agregan SUVs de naturaleza zwitteriónica. Asimismo, este valor de K_P igual a 2 presenta una gran discordancia con el encontrado en ese mismo estudio, para L-FABP (subfamilia I) para la cual el valor de la constante de partición asciende a 51, poniendo de relieve la gran preferencia del AOFA por LFABP en relación a las SUVs (Storch & Bass, 1990).

Cálculo de la Velocidad de Transferencia

Habiendo adquirido una noción aproximada sobre la afinidad de unión As-p18•AOFA, así como sobre la distribución relativa del ligando frente a proteína y membranas, pueden establecerse las condiciones de los ensayos de cinética. Estos ensayos se basan en la transferencia de energía de resonancia de Förster en el par FRET constituido por el grupo antroiloxi del AOFA y el grupo NBD no intercambiable presente en las SUVs. En estos ensayos se mide el decaimiento de la señal fluorescente, que se atribuye al pasaje del AOFA desde la proteína hacia las SUVs conteniendo al *quencher* NBD-PC. Por esta razón debe garantizarse el flujo unidireccional de ligando desde proteína a membranas,

lo cual se logra ajustando las concentraciones de las sustancias empleadas, de acuerdo a los valores de K_p (Kim & Storch, 1992^b). La transferencia de ligandos desde FABPs a membranas se postula que puede ocurrir mediante dos mecanismos alternativos. En el mecanismo denominado “colisional”, el paso limitante parece ser la interacción de la proteína con la membrana. Por su parte, el mecanismo “difusional” implicaría un paso limitante relacionado con la disociación del ligando desde la cavidad de la proteína (Córsico et al., 2004). La evaluación de los efectos en la velocidad de transferencia, por parte de las distintas fuerzas que impulsan y modulan sendos mecanismos, permite reconocer el mecanismo mediante el cual las FABPs transferirían su carga. De esta manera, para las FABPs de tipo “colisional”, la velocidad de transferencia se verá afectada por factores asociados a la frecuencia de colisión. Por ejemplo, si se aumenta la concentración de membranasceptoras, se espera un aumento proporcional en la velocidad de transferencia. Contrariamente, en una FABP donde el mecanismo de transferencia, presenta su paso limitante en la salida del ligando, su velocidad de transferencia no se verá particularmente afectada por el incremento en la concentración de vesículasceptoras. Por otro lado, el efecto de la fuerza iónica del medio puede brindar más indicios respecto a cómo se modulan las velocidades de transferencias de manera diferencial para cada uno de los dos mecanismos, con interpretaciones un poco más complejas que para el caso de la variación en la concentración de vesículas (Hsu & Storch, 1996; Pórfido et al., 2012). En estos ensayos preliminares se procedió acorde a lo descrito por Córscico et al. (2005). Como se esquematiza en el panel izquierdo de la Figura 7.13, un volumen de As-p18 incubada previamente con 12AO, se mezcló con las SUVs conteniendo NBD-PC, empleando un espectrofluorómetro con módulo de *stopped flow* RX2000 (Applied Photophysics Ltd). La transferencia del ligando fluorescente desde la FABP hacia membranas fue seguido como el decaimiento en la fluorescencia del AOFA en el tiempo. Las condiciones de transferencias fueron: 7 μ M As-p18; 0.25 μ M 12AO; SUVs en un rango para obtener una relación [SUVs]:[As-p18] entre 7.5:1 y 30:1 mol:mol. Se utilizó buffer TBS y la temperatura de trabajo fue de 25 °C. Antes de cada experimento se realizaron controles para corroborar la eliminación del *photobleaching*. La variación de fluorescencia en el tiempo se ajustó a una función de decaimiento exponencial simple de acuerdo a la ecuación:

$$F(t) = A \times e^{-b \times t} + C \quad (7.6)$$

donde b corresponde a la velocidad inicial de transferencia del ligando medida en s^{-1} . El ajuste de los datos se llevó a cabo con el programa *SigmaPlot*. Para evaluar el efecto de la concentración de vesículas aceptoras se ensayaron tres concentraciones de SUVs zwitteriónicas de manera tal que la relación SUVs:proteína mol:mol probadas fueron 7.5:1; 15:1; 30:1. El impacto de la fuerza iónica del medio se observó registrando las cinéticas de transferencia con NaCl en concentraciones de 100, 500 y 1000 mM (en presencia de una relación SUVs:As-p18 igual a 7.5:1 mol:mol).

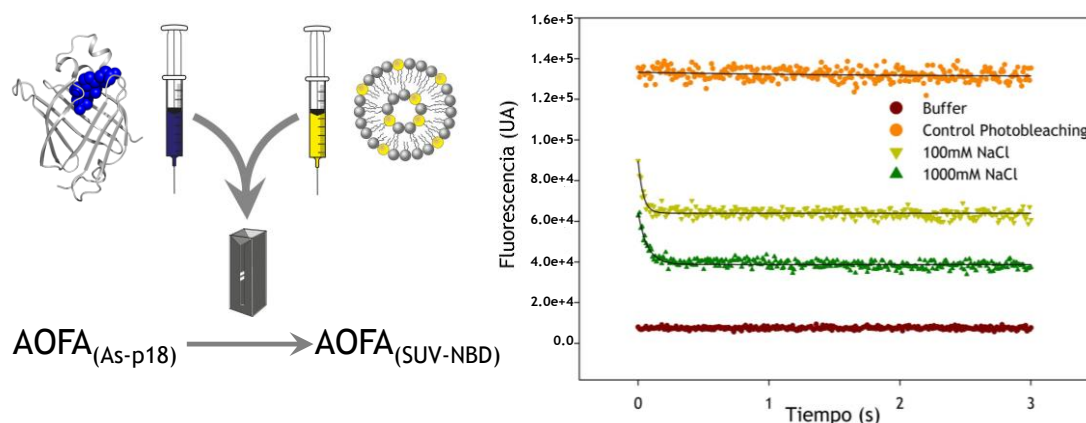


Figura 7.13. Ensayo de transferencia de AOFA. En el panel izquierdo se muestran un esquema del ensayo cinético de FRET, que permite analizar la transferencia de derivados fluorescentes de ácido graso, entre As-p18 y membranas modelo. En el panel derecho se grafica el efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia de AOFA.

Los experimentos preliminares anticiparon velocidades de transferencia elevadas. El rango de condiciones en que se determinaron las velocidades permitió una comparación general con otras FABPs. El orden de las velocidades de transferencia para el 12AO se asemeja al que presentan las FABP de la subfamilia IV, HFABP y AFABP (Kim & Storch, 1992^b; Wootan et al., 1993). Para evaluar los efectos de la concentración de SUVs y fuerza iónica resulta necesario contar con un número importante de repeticiones que minimicen el efecto del ruido de la señal. Si bien podría vislumbrarse una tendencia en los ensayos que se muestran en la Figura 7.14, una estimación confiable de la velocidad de transferencia suele basarse en el promedio de cinco o más replicados (Córsico et al., 1998; De Gerónimo et al., 2010; Pórfido et al., 2012). Las concentraciones empleadas garantizaron el flujo unidireccional del ligando desde As-p18 hacia las SUVs, sin embargo la alta relación SUV/As-p18•12AO dificultó el registro del decaimiento de la señal para la relación 30:1. A partir de las condiciones

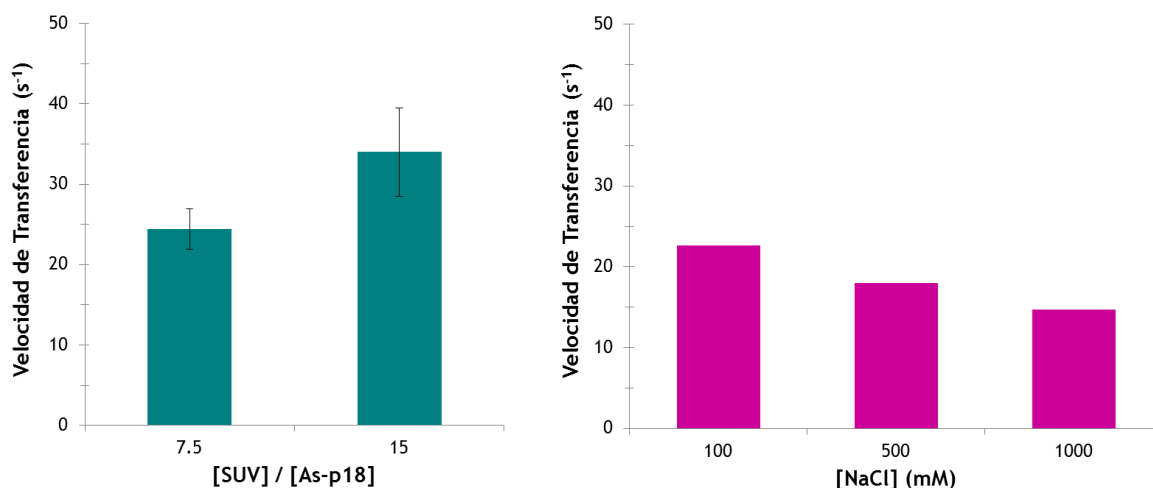


Figura 7.14. Ensayo preliminar que muestra el efecto de la concentración de vesículas y fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia del 12AO. Se muestran los resultados para dos y una sola determinación, respectivamente.

y resultados obtenidos, podrían optimizarse las variables para futuros ensayos, considerando además un número de repeticiones, mayor o igual a cinco, para un tratamiento estadístico adecuado en las comparaciones. Adicionalmente, se podrían ensayar distintas composiciones de membranas además de las zwitteriónicas: SUVs con 25% PS (una carga superficial negativa), y con 25% CL (dos cargas negativa por molécula de fosfolípido) para evaluar el efecto de la densidad de carga de la superficie de las vesículas aceptoras (Thumser & Storch, 2000). Los cambios en este último factor revelarían si hay involucradas interacciones electrostáticas entre la proteína dadora y las membranas aceptoras (Storch et al., 2002), tal como se anticipa de acuerdo al análisis del potencial de superficie de la estructura de As-p18 en el Capítulo 6.

7.7 Discusión y Conclusiones

Los estudios de unión a lípidos mediante TLC y cromatografía gaseosa mostraron que la proteína recombinante une de manera exclusiva AGs dentro del entorno lipídico provisto por *E. coli*. Entre los AGs unidos, se comprobó un enriquecimiento relativo en ácido oleico. La particular afinidad por este lípido se corroboró mediante experimentos de fluorescencia, involucrando el desplazamiento competitivo de la sonda fluorescente, DAUDA.

Situando en el contexto bibliográfico la afinidad relativa por los ácidos grasos saturados de distinta longitud de cadena, es interesante destacar que As-p18 no sigue la regla

general establecida. La llamada *hipótesis de la solubilidad* enunciada por el grupo de Kleinfeld (Richieri et al., 1994) y referida en numerosos trabajos de otros autores (Londraville, 1996; Richieri et al., 2000; Zimmerman et al., 2001; Furahashi & Hotamisligil, 2008; Storch & McDermott, 2009), considera que una mayor hidrofobicidad del ligando está acompañada de una mayor afinidad de unión por parte de la FABP. Si bien se consideran algunas excepciones a esta tendencia general, esta regla implica que no hay especificidad de ligando intrínseca por parte de las FABPs, asociando la unión a la solubilidad del AG. Sucesivos estudios ampliaron la hipótesis para considerar además a los AGs insaturados, que mostraban una afinidad incrementada que no podía explicarse en términos de solubilidad. Subsecuentemente, estudios con una variedad de ligandos más amplia, permitieron determinar preferencias de unión particulares para grupos de FABPs: E-FABP afinidad por AGs saturados, I-FABP por saturados y monoinsaturados, H-FABP con AGs poliinsaturados de la serie n-6, L-FABP con AGs mono y poliinsaturados de la serie n-3, y B-FABP con AG poliinsaturados de la serie n-3 (Haunerland & Spener, 2004) y las FABPs de la subfamilia I, por retinoides (Lücke et al., 2003). Respecto a As-p18, los estudios por GC y fluorescencia indican que su afinidad por distintos AGs no cumple con la teoría de la solubilidad, aún considerando los AGs saturados únicamente (por ejemplo, mayor desplazamiento del DAUDA por 14:0 que por 18:0). La afinidad por el AG monoinsaturado 18:1 se destaca por sobre las demás especies. Respecto a otros ligandos, se ha reportado que As-p18 no une retinol (Mei et al., 1997). La marcada afinidad por el ácido oleico también se ha reportado en otra nemFABP. Bm-FAB-1 proveniente del parásito *Brugia malayi*, presenta una afinidad significativamente mayor para este AG por sobre otros saturados y poliinsaturados (Michalski et al., 2002). Para As-p18 podría ampliarse la variedad de ligandos ensayados, e incluir por ejemplo, especies poliinsaturadas.

Respecto a las implicancias funcionales de la particular afinidad por ácido oleico, es probable que sea el sustrato natural preferido por As-p18. El ácido oleico es el AG más común en mamíferos, insectos y nematodos y es un componente fundamental de los lípidos estructurales (Michalski et al., 2002).

Los estudios por ITC y RMN, permitieron establecer un único sitio de unión, de alta afinidad, con valores de K_D congruentes entre sí.

El análisis termodinámico de la unión As-p18 a ácido oleico indica que el proceso está gobernado por un fuerte componente entálpico y penalizado por efectos de naturaleza entrópica. La comparación con las marcas termodinámicas de otras FABPs, reveló como factor común, que la unión a ácidos grasos es impulsada entálpicamente (Maatman et al., 1994; LaLonde et al., 1994; Balendiran et al., 2000; Richieri et al., 2000), ponderando la estabilización del grupo carboxilato del ligando mediante interacciones electrostáticas. En la estructura de As-p18 la estabilización de este grupo se atribuye a la triada conformada por las cadenas laterales de los residuos 43Lys, 138Arg y 140Tyr.

Mediante el análisis de las perturbaciones de corrimiento químico, pudieron identificarse aquellos residuos afectados en el proceso de unión del ácido oleico. Para ubicar de manera exclusiva a los aminoácidos que interaccionan con el ligando resultó fundamental conocer la estructura en solución de As-p18, ya que la aproximación por CSP no los discrimina de los residuos indirectamente afectados. La mayor parte de los aminoácidos perturbados encuentran correlato con la interacción directa al ligando y los cambios conformacionales de la transición apo → holo.

En base a estudios de secuencia, y de acuerdo a lo comentado en el Capítulo 6 sobre el potencial de carga positivo en el dominio hélice-vuelta-hélice, y la naturaleza anfipática de α -I, se anticipa que la transferencia de los ácidos grasos desde As-p18 hacia vesículas o membranas modelo podría ocurrir mediante interacciones proteína-membrana, como parte de un mecanismo colisional. Los estudios de carácter preliminar deben expandirse y mejorarse a fin de determinar qué factores modulan dicha interacción. Futuros estudios, podrían ser realizados para analizar el efecto de la naturaleza de las membranas en la transferencia de ligandos.

De manera complementaria a los estudios de FRET, puede recabarse información muy valiosa a través de las simulaciones por dinámica molecular. El modelado computacional representa una herramienta útil para el análisis de las interacciones FABP-membranas, y los estudios reportados en el área demuestran ser consistentes con los datos obtenidos de manera experimental (Mihajlovic & Lazaridis, 2007; Zamarreño et al., 2012). En particular para el análisis de As-p18 en la interacción con membranas, estudios preliminares llevados a cabo en el grupo del Dr. Costabel (UNS), a partir de la

estructura generada en este trabajo de Tesis, indicarían un comportamiento inusual respecto a las FABPs previamente reportadas (Zamarreño et al., 2013).

7.8 Bibliografía

Balendiran GK, Schnutgen F, Scapin G, Borchers T, Xhong N, Lim K, Godbout R, Spener F, Sacchettini JC. (2000) Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 275(35):27045-54.

Collins JM, Dominey RN, Grogan WM. (1990) Shape of the fluidity gradient in the plasma membrane of living HeLa cells. *J Lipid Res* 31(2):261-70.

Cooper A, Johnson CM. (1994) Introduction to microcalorimetry and biomolecular energetics. *Methods Mol Biol* 22: 109-124.

Córsico B, Cistola DP, Frieden C, Storch J. (1998) The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12174-8.

Córsico B, Liou HL, Storch J. (2004) The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry* 43, 3600-7.

Córsico B, Franchini GR, Hsu KT, Storch J. (2005) Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J Lipid Res* 46(8):1765-72.

Cronan JE. (1975) Thermal regulation of the membrane lipid composition of *Escherichia coli*. Evidence for the direct control of fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 250(17): 7074-7077.

De Gerónimo E, Hagan RM, Wilton DC, Córsico B. (2010) Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim Biophys Acta* 1801(9):1082-9.

De Gerónimo E. (2011) Análisis de la interacción de proteínas que unen ácidos grasos con membranas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Falomir-Lockhart LJ, Laborde L, Kahn PC, Storch J, Córsico B. (2006) Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes. Support for a multistep process. *J Biol Chem* 281(20):13979-89.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.

Franchini GR, Storch J, Corsico B. (2008) The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1781(4):192-9.

Furuhashi M, Hotamisligil GS. (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7(6):489-503.

Goldflam M, Tarragó T, Gairí M, Giralte E. (2012) NMR studies of protein-ligand interactions. *Methods Mol Biol* 831:233-59.

Gomis Yagües V. (2008) Tema 3. Cromatografía de gases. Manuales online del Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Alicante. <http://hdl.handle.net/10045/8247>.

Gomori G. (1942) A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J Lab Clin Med* 27: 955-960.

González Flecha, FL. (2013) Análisis estructural y funcional de Macromoléculas. EDULP. 1ra Edición. ISBN: 978-950-34-1057-8. Capítulo 12: 343-363.

Hauerland NH, Spener F. (2004) Properties and physiological significance of fatty acid-binding proteins. *Adv Mol Cell Biol* 33: 99-122.

He Y, Estephan R, Yang X, Vela A, Wang H, Bernard C, Stark RE. (2011) A nuclear magnetic resonance-based structural rationale for contrasting stoichiometry and ligand binding site(s) in fatty acid-binding proteins. *Biochemistry* 50(8):1283-95.

Hodsdon ME, Cistola DP. (1997a) Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry* 36(6):1450-60.

Hodsdon ME, Cistola DP. (1997b) Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-

binding protein as monitored by ^{15}N NMR relaxation and ^1H exchange. *Biochemistry* 36(8):2278-90.

Hsu KT, Storch J. (1996) Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem* 271(23):13317-23.

Huang C, Thompson TE. (1974) Preparation of homogeneous, single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Methods Enzymol* 32:485-9.

Iglesias Bexiga, MA. (2011) Dominios ww: estudio del equilibrio conformacional y del reconocimiento de ligandos. Tesis Departamento de Química Física. Universidad de Granada.

Kaneshiro T, Marr AG. (1961) Cis-9,10-methylene hexadecanoic acid from the phospholipids of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 236: 2615-2619.

Kim HK, Storch J. (1992a) Free fatty acid transfer from rat liver fatty acid-binding protein to phospholipid vesicles. Effect of ligand and solution properties. *J Biol Chem* 267(1):77-82.

Kim HK, Storch J. (1992b) Mechanism of free fatty acid transfer from rat heart fatty acid-binding protein to phospholipid membranes. Evidence for a collisional process. *J Biol Chem* 267(28):20051-6.

Kleckner IR, Foster MP. (2011) An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1814(8):942-68.

LaLonde JM, Levenson MA, Roe JJ, Bernlohr DA, Banaszak LJ. (1994) Adipocyte lipid-binding protein complexed with arachidonic acid. Titration calorimetry and X-ray crystallographic studies. *J Biol Chem* 269(41):25339-47.

Londraville RL. (1996) Intracellular fatty acid-binding proteins: putting lower vertebrates in perspective. *Braz J Med Biol Res* 29(6):707-20.

Lücke C, Gutierrez-Gonzalez H, Hamilton JA. (2003) Intracellular lipid binding proteins: evolution, structure, and lipid binding. In: *Cellular proteins and their fatty acids in health and disease* (eds. Dutta-Roy A & Spener F). Weinheim, Germany: Wiley VCH; p. 95-114.

Maatman RG, Degano M, Van Moerkerk HT, Van Marrewijk WJ, Van der Horst DJ, Sacchettini JC, Veerkamp JH. (1994) Primary structure and binding characteristics of locust and human muscle fatty-acid-binding proteins. *Eur J Biochem* 221(2):801-10.

Marr AG, Ingraham JL. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 84(6): 1260-1267.

Maté SM, Brenner RR, Ves-Losada A. (2004) Phosphatidyl choline fatty acid remodeling in the hepatic cell nuclei. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(1):49-57.

Massey JB, Bick DH, Pownall HJ. (1997) Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys J* 72(4):1732-43.

Mei B, Kennedy MW, Beauchamp J, Komuniecki RP, Komuniecki R. (1997) Secretion of a novel developmentally regulated fatty acid binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 272: 9933-9941.

Michalski ML, Monsey JD, Cistola DP, Weil GJ. (2002) An embryo-associated fatty acid-binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 124(1-2):1-10.

Mihajlovic M, Lazaridis T. (2007) Modeling fatty acid delivery from intestinal fatty acid binding protein to a membrane. *Protein Sci* 16(9):2042-55.

Miller DM 3rd, Olson JS, Pflugrath JW, Quirocho FA. (1983) Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem* 258(22):13665-72.

Morand O, Fibach E, Dagan A, Gatt S. (1982) Transport of fluorescent derivatives of fatty acids into cultured human leukemic myeloid cells and their subsequent metabolic utilization. *Biochim Biophys Acta* 711(3):539-50.

Morrison WR, Smith LM. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res* 5: 600-608.

Obal G, Ramos AL, Silva V, Lima A, Batthyany C, Bessio MI, Ferreira F, Salinas G, Ferreira AM. (2012) Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5):e1642.

Pellecchia M, Bertini I, Cowburn D, Dalvit C, Giralt E, Jahnke W, James TL, Homans SW, Kessler H, Luchinat C, Meyer B, Oschkinat H, Peng J, Schwalbe H, Siegal G. (2008) Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat Rev Drug Discov* 7(9):738-45.

Porfido JL, Alvite G, Silva V, Kennedy MW, Esteves A, Corsico B. (2012) Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. *PLoS Negl Trop Dis* 6(11):e1893.

- Prior A, Jones JT, Blok VC, Beauchamp J, McDermott L, Cooper A, Kennedy MW. (2001) A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochem J* 356(Pt 2):387-94.
- Rabinowitch HD, Sklan D, Chace DH, Stevens RD, Fridovich I. (1993) *Escherichia coli* produces linoleic acid during late stationary phase. *J Bacteriol* 175(17): 5324-5328.
- Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. (1994) Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J Biol Chem* 269(39):23918-30.
- Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM. (2000) Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry* 39(24):7197-204.
- Rodríguez Mías RA. (2006) NMR in drug discovery. From screening to structure-based design of antitumoral agents. Tesis Departamento de Química Orgánica. Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/10803/2804>.
- Schumann FH, Riepl H, Maurer T, Gronwald W, Neidig KP, Kalbitzer HR. (2007) Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *J Biomol NMR* 39(4):275-89.
- Sha RS, Kane CD, Xu Z, Banaszak LJ, Bernlohr DA. (1993) Modulation of ligand binding affinity of the adipocyte lipid-binding protein by selective mutation. Analysis in vitro and in situ. *J Biol Chem* 268(11):7885-92.
- Storch J, Kleinfeld AM. (1986) Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 25(7):1717-26.
- Storch J, Bass NM, Kleinfeld AM. (1989) Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J Biol Chem* 264(15), 8708-8713.
- Storch J, Bass NM. (1990) Transfer of fluorescent fatty acids from liver and heart fatty acid-binding proteins to model membranes. *J Biol Chem* 265(14):7827-31.
- Storch J. (1993) Diversity of fatty acid-binding protein structure and function: studies with fluorescent ligands. *Mol Cell Biochem* 123(1-2):45-53.
- Storch J, Thumser AE. (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1486(1):28-44.
- Storch J, Veerkamp JH, Hsu KT. (2002) Similar mechanisms of fatty acid transfer from human and rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle, and adipose tissue FABPs. *Mol Cell Biochem* 239(1-2):25-33.
- Storch J, McDermott L. (2009) Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res* 50 Suppl:S126-31.
- Thumser AE, Storch J. (2000) Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J Lipid Res* 41(4):647-56.
- Williamson MP. (2013) Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 73:1-16.
- Wootan MG, Bass NM, Bernlohr DA, Storch J. (1990) Fatty acid binding sites of rodent adipocyte and heart fatty acid binding proteins: characterization using fluorescent fatty acids. *Biochemistry* 29(40):9305-11.
- Wootan MG, Bernlohr DA, Storch J. (1993) Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry* 32(33):8622-7.
- Xu ZH, Buelt MK, Banaszak LJ, Bernlohr DA. (1991) Expression, purification, and crystallization of the adipocyte lipid binding protein. *J Biol Chem* 266(22):14367-70.
- Zamarreño F, Herrera FE, Córscico B, Costabel MD. (2012) Similar structures but different mechanisms: Prediction of FABPs-membrane interaction by electrostatic calculation. *Biochim Biophys Acta* 1818(7):1691-7.
- Zamarreño F, Ibáñez-Shimabukuro M, Córscico B, Costabel MD. (2013) *Ascaris suum*'s FABP, As-p18, shows ambiguous behavior in its interaction with biological membranes. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. ISBN 978-987-27591-2-4. TMSB15.
- Zanotti G, Feltre L, Spadon P. (1994) A possible route for the release of fatty acid from fatty acid-binding protein. *Biochem J* 301 (Pt 2):459-63.
- Zimmerman AW, van Moerkerk HT, Veerkamp JH. (2001) Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 33(9):865-76.

8. Conclusiones Generales y Perspectivas

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

8. Conclusiones Generales y Perspectivas

8.1 Discusión y Conclusiones Generales

En el presente trabajo de Tesis, se caracterizaron las propiedades estructurales, dinámicas y de unión a lípidos de la proteína del nematodo *Ascaris suum*, As-p18. Para ello, en primer lugar, se pusieron a punto los protocolos para la obtención y purificación de la proteína en forma recombinante y con el marcado isotópico correspondiente. Mediante la aplicación de técnicas cromatográficas fue posible obtener muestras en concentración, pureza y condiciones compatibles con los requisitos que demandan los estudios de biología estructural y biofísicos.

Los estudios por RMN mostraron que As-p18 presenta componentes estructurales que caracterizan a la familia de FABPs. Dentro de los mismos se mencionan: el barril β , formado por 10 hebras beta antiparalelas, cubierto por el motivo hélice-vuelta-hélice; la hendidura o *gap* entre las hebras β D y β E; una cavidad interna que incluye al sitio de unión al ligando y que involucra residuos de aminoácidos polares e hidrofóbicos; y una región portal postulada como lugar de entrada del ligando, delimitada por los *loops* entre β C- β D y β E- β F, y la α -hélice II (Banaszak et al., 1994). Sin embargo, a pesar de presentar un plegamiento de FABP canónico, As-p18 mostró características que lo diferencian de cualquier estructura de FABP descrita hasta ahora. Los *loops* ubicados entre las hebras β B y β C, y β G y β H, son notablemente más largos que los presentados por cualquier otra FABP, llegando al doble de longitud para el primer caso. Análisis previos de un modelo por homología de As-p18 habían anticipado inserciones inusuales en la estructura, si bien no habían sido correctamente posicionadas, probablemente debido al bajo porcentaje de identidad de secuencia con la proteína utilizada como molde (Mei et al., 1997).

A partir de comparaciones cualitativas de espectros se prevé que la forma apo de As-p18 presente una flexibilidad incrementada en la región portal, la cual podría ser de importancia para el evento de unión al ligando (Hodson & Cistola, 1997^{a/b}). Una vez que esto ocurre, un efecto estabilizador contribuiría a aumentar los parámetros de orden, (S^2) reflejados en el perfil rígido determinado a partir de los experimentos de dinámica.

En cuanto a los residuos que estabilizan la unión del ligando, se comprobó la participación de la 43Lys, que dada su ubicación en la proteína, representa un elemento atípico respecto a lo observado para otras FABPs. Los otros dos residuos involucrados en la estabilización del grupo carboxilato del AG serían 138Arg y 140Tyr. Los aminoácidos hidrofóbicos que protruyen hacia el exterior, flanqueando la región portal, podrían estar potencialmente involucrados en interacciones proteína-proteína o proteína-membrana. Por otro lado, las características de los residuos expuestos en superficie y en especial el potencial neto positivo descrito en esta zona, indican que As-p18 sería capaz de transferir ácidos grasos a membranas mediante un mecanismo de naturaleza colisional.

Los estudios de unión a lípidos mediante TLC y cromatografía gaseosa mostraron que la proteína recombinante une de manera exclusiva AG dentro del entorno lipídico provisto por *E. coli*. El análisis diferencial de los distintos AGs unidos, mostró un enriquecimiento relativo de ácido oleico. La particular afinidad por este lípido se corroboró mediante experimentos de fluorescencia involucrando el desplazamiento competitivo de la sonda fluorescente, DAUDA. Asimismo estudios por ITC y RMN, permitieron establecer un único sitio de unión, de alta afinidad, donde la contribución entálpica es preponderante. Esta contribución podría atribuirse, al menos parcialmente, a la estabilización del anión carboxilato del AG con los grupos ionizables de 43Lys y 138Arg.

Respecto a la capacidad de As-p18 para ceder AGs a membranas modelo, ensayos basados en FRET revelaron velocidades de transferencias elevadas. Comparando con ensayos similares en otras FABPs, As-p18 se comporta de manera similar a H-FABP, y en contraste con L-FABP que exhibe velocidades de transferencia notablemente inferiores (Kim & Storch, 1992^{a/b}). Esto estaría en concordancia con la distancia filogenética que presentan los grupos de proteínas a los que pertenecen.

En relación a los estudios preliminares para establecer el mecanismo por el cual se produce la transferencia, aun cuando no pudieron acumularse suficientes resultados, sí pudieron establecerse las condiciones experimentales apropiadas y se han comenzado a analizar algunas variables, observándose que el proceso parece ser modulado por la fuerza iónica del medio. Los estudios deberán continuarse con un análisis detallado y exhaustivo de los mecanismos de transferencia y los factores que la modulan. La

información eventualmente obtenida, junto con los estudios por modelado computacional, brindarían información valiosa sobre el comportamiento de As-p18 frente a modelos de membranas biológicas.

En cuanto a la función que desempeñaría As-p18, uno de los escenarios más verosímiles se relaciona a los eventos metabólicos que ocurren dentro del huevo. En este sentido, es importante destacar el ampliamente conocido vínculo entre la concentración de las FABPs y la capacidad de un tejido para oxidar ácidos grasos. El artículo de Londrville (1996) cita dos ejemplos emblemáticos. El primero de ellos lo constituye H-FABP que aumenta ininterrumpidamente su expresión en el corazón de rata de manera sincronizada con el pasaje del metabolismo basado en carbohidratos al basado en ácidos grasos. El segundo ejemplo ocurre en las langostas migratorias en las cuales la concentración de FABPs se incrementa a partir de la fase preparatoria para la migración. En ambos casos, se resalta el rol de las FABPs en el mantenimiento de un flujo elevado de ácidos grasos hacia la β -oxidación. De manera análoga, podría contextualizarse el aumento de concentración de As-p18 con el aumento del potencial aeróbico en los huevos embrionados, y su capacidad para metabolizar los ácidos grasos, tal como se revela en los cambios producidos en las reservas lipídicas. De hecho, otro concepto que refuerza esta idea, es que las FABPs con velocidades de transferencia elevadas, como las que presentaría As-p18, se encuentran en los tejidos con las demandas más altas de β -oxidación, mientras que por el contrario, las FABPs “lentas” se expresan mayormente en los tejidos destinados al almacenamiento y modificación de ácidos grasos (Londrville, 1996). De acuerdo con lo expresado, también cobra relevancia la gran afinidad de As-p18 determinada para el ligando 18:1, siendo este AG uno de los más utilizados durante el desarrollo de la larva (Jezyk & Fairbairn, 1969).

Dado que dentro de la cáscara del huevo ocurren un número de mudas en las larvas ($L_1 \rightarrow L_2 \rightarrow L_3$), otra alternativa, aunque sin evidencia comprobada, es que As-p18 en calidad de proteína que une compuestos hidrofóbicos, cumpliera su función biológica secuestrando hormonas de desarrollo potencialmente liberadas durante la muda (Komuniecki R, comunicación personal).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis contribuyen al conocimiento de un nuevo *subcluster* dentro de la familia de las FABPs, abarcando el

estudio de la estructura tridimensional, la dinámica y comportamiento de la proteína As-p18. Es importante remarcar que los estudios desarrollados en este trabajo de Tesis son los primeros en abordar la determinación estructural de una nemFABP. En conjunto con el análisis biofísico realizado, podría contribuir a la comprensión del rol de As-p18 en los huevos infectivos de *A. suum*. De manera más general, constituyen el paso inicial para el mejor entendimiento de este novedoso grupo de proteínas pertenecientes a un grupo biológico tan interesante como los nematodos, quienes presentan particularidades no halladas en ningún otro animal multicelular.

8.2 Perspectivas

El estudio de proteínas provenientes de agentes parasitarios de importancia epidemiológica, que además poseen características diferenciales respecto a las proteínas de mamíferos, presenta un panorama interesante en el campo del descubrimiento de nuevos blancos de terapias antihelmínticas y/o de candidatos para vacunas. En este sentido, cabe mencionar que si bien las drogas administradas para combatir la ascariasis son actualmente efectivas, existe una preocupación creciente respecto a la aparición de resistencias, causadas por los frecuentes ciclos de tratamiento y reinfección en las zonas endémicas (Hagel & Giusti, 2010). Más allá del atractivo en la aparente conexión del estudio de las nemFABPs con nuevas terapias y vacunas, es importante considerar aspectos básicos, concernientes a la factibilidad de dicha conexión. Por un lado, es poco probable que As-p18 represente un candidato exitoso para vacunas debido a que las proteínas del líquido perivitelino no serían accesibles al sistema inmune del huésped. En relación a este tema, en un artículo muy reciente (Zhan et al., 2014) que reporta los estudios preliminares conducidos para el desarrollo de una vacuna pan-antihelmíntica, en la que se incluyen proteínas de áscaris; se emplean aquellas provenientes del líquido de Excreción/Secreción y de la superficie de las larvas y adultos.

No obstante, la existencia generalizada de las nemFABPs en los nematodos, como una nueva clase de FABPs embrionarias, secretadas, con características de unión de lípidos potencialmente específicas, plantea la posibilidad de considerar a estas moléculas como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos, con actividad de amplio espectro contra nematodos parásitos, de plantas y animales. La marcada especificidad de ligando que exhibe As-p18 se relacionaría con una cavidad interna que define un entorno compacto y altamente especializado para la unión de ácidos grasos de cadena larga. En este

sentido, la naturaleza de las cadenas laterales que modelan la superficie y el volumen de la cavidad, se halla intrínsecamente vinculada a la especificidad de ligando (Hauerland & Spenner 2004). Dada la gran identidad de secuencia con otras nemFABPs esto puede ser aprovechado en futuras investigaciones que aborden el diseño de inhibidores específicos. Aun cuando el alcance del potencial antihelmíntico sería limitando para el caso concreto de As-p18 (dado que la proteína se encontraría confinada en el huevo de áscaris), podría emplearse a esta nemFABP de estructura conocida, como punto de partida para el estudio de otras proteínas considerablemente similares, como la perteneciente al parásito, *Brugia malayi*. De hecho, el modelado para la nemFABP de este organismo (Bm-FAB-1), utilizando a As-p18 como molde, brindó un resultado robusto a partir del cual se podrían establecer los contactos proteína:ligando. La potencial unión selectiva de ligandos por parte de Bm-FAB-1 podría explotarse en términos farmacológicos para el tratamiento de la filariasis o podría utilizarse a la proteína como un medio para facilitar la entrada de drogas en el parásito. Tales drogas podrían interferir con la reproducción, esterilizar los gusanos adultos, y con ello interrumpir la transmisión (Michalski et al., 2002).

En cuanto al diseño racional de fármacos específicos, existen antecedentes para ciertas FABPs que avalan la materialización del objetivo (Furuhashi et al., 2007; Hertz et al., 2009; Berger et al., 2012).

8.3 Bibliografía

Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. (1994) Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem* 45:89-151.

Berger WT, Ralph BP, Kaczocha M, Sun J, Balus TE, Rizzo RC, Haj-Dahmane S, Ojima I, Deutsch DG. (2012) Targeting fatty acid binding protein (FABP) anandamide transporters - a novel strategy for development of anti-inflammatory and anti-nociceptive drugs. *PLoS One* 7(12):e50968.

Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS. (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447(7147):959-65.

Hagel I, Giusti T. (2010) *Ascaris lumbricoides*: an

overview of therapeutic targets. *Infect Disord Drug Targets* 10(5):349-67.

Hauerland NH, Spener F. (2004) Properties and physiological significance of fatty acid-binding proteins. *Adv Mol Cell Biol* 33: 99-122.

Hertz AV, Hellberg K, Reynolds JM, Kruse AC, Juhlmann BE, Smith AJ, Sanders MA, Ohlendorf DH, Suttles J, Bernlohr DA. (2009) Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *J Med Chem* 52(19):6024-31.

Hodsdon ME, Cistola DP. (1997a) Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry* 36(6):1450-60.

Hodsdon ME, Cistola DP. (1997b) Ligand binding

alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by ^{15}N NMR relaxation and ^1H exchange. *Biochemistry* 36(8):2278-90.

Jezyk PF, Fairbairn D. (1969) Quantitative aspects of lipid utilization during embryogenesis of *Ascaris suum* eggs. *J Parasitol* 55(3):477-9.

Kim HK, Storch J. (1992a) Free fatty acid transfer from rat liver fatty acid-binding protein to phospholipid vesicles. Effect of ligand and solution properties. *J Biol Chem* 267(1):77-82.

Kim HK, Storch J. (1992b) Mechanism of free fatty acid transfer from rat heart fatty acid-binding protein to phospholipid membranes. Evidence for a collisional process. *J Biol Chem* 267(28):20051-6.

Londraville RL. (1996) Intracellular fatty acid-binding

proteins: putting lower vertebrates in perspective. *Braz J Med Biol Res* 29(6):707-20.

Mei B, Kennedy MW, Beauchamp J, Komuniecki RP, Komuniecki R. (1997) Secretion of a novel developmentally regulated fatty acid binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 272: 9933-9941.

Michalski ML, Monsey JD, Cistola DP, Weil GJ. (2002) An embryo-associated fatty acid-binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 124(1-2):1-10.

Zhan B, Beaumier CM, Briggs N, Jones KM, Keegan BP, Bottazzi ME, Hotez PJ. (2014) Advancing a multivalent 'Pan-anthelmintic' vaccine against soil-transmitted nematode infections. *Expert Rev Vaccines* 13(3):321-31.

9. Apéndice

Esta página ha sido dejada en blanco intencionalmente

9. Apéndices

Apéndice A - Asignación de las resonancias de ^1H , ^{15}N y ^{13}C de holoAs-p18

Los experimentos se llevaron a cabo en buffer 20 mM NaPi, 20 mM NaCl, 1 mM NaN_3 pH 7.4, a 298 K.

Residuo	H	N	ND	NE	HA	HB	HG	HD	HE	HZ	HH	C	CA	CB	CG	CD	CE	CZ	CH
-11 Met	-	-	-	-	3.75	2.52 2.52	2.40 2.40	-	2.03	-	-	-	55.80	31.49	35.08	-	16.81	-	-
-10 Arg	-	-	-	-	4.33	1.77 1.84	1.63 1.63	3.15 3.15	-	-	-	-	56.47	30.86	27.13	43.34	-	-	-
-9 Gly	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-8 Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-7 His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-6 His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-5 His	-	-	-	-	4.55	2.98 2.98	-	-	7.72	-	-	-	56.38	31.05	-	-	138.51	-	-
-4 His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-3 His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-2 His	-	-	-	-	-	3.12 3.12	-	-	7.79	-	-	-	56.42	30.97	-	-	138.48	-	-
-1 Gly	-	-	-	-	3.97 3.97	-	-	-	-	-	-	174.09	45.21	-	-	-	-	-	-
0 Ser	8.27	116.03	-	-	4.50	3.88 3.88	-	-	-	-	-	174.43	58.57	64.08	-	-	-	-	-
1 Lys	8.55	122.74	-	-	4.56	1.74 1.90	1.52 1.43	1.64 1.72	2.97 2.91	-	-	175.38	55.87	34.29	24.95	29.61	42.11	-	-
2 Thr	7.96	116.53	-	-	4.63	3.86	1.18	-	-	-	-	173.93	60.98	70.81	22.32	-	-	-	-
3 Leu	8.18	127.98	-	-	4.20	1.25 0.28	1.40	0.43 0.22	-	-	-	173.83	52.06	43.57	25.71	25.95 25.52	-	-	-
4 Pro	-	-	-	-	4.41	2.61 1.95	2.42 2.18	4.39 3.58	-	-	-	176.42	63.53	32.89	27.94	51.81	-	-	-
5 Asp	8.48	122.18	-	-	4.22	2.69 2.69	-	-	-	-	-	178.35	57.22	40.75	-	-	-	-	-
6 Lys	8.03	115.76	-	-	4.23	1.66	0.07	1.40	2.86	-	-	176.05	57.36	31.18	23.09	29.92	41.86	-	-

						1.66	0.94	1.46	2.86										
7 Phe	7.76	117.93	-	-	4.16	2.27 2.70	-	6.77	-	-	-	172.68	59.75	39.52	-	130.95	-	-	-
8 Leu	7.27	114.06	-	-	4.41	1.36 2.04	1.65	1.04 0.69	-	-	-	177.11	54.38	41.99	26.54	26.26 23.59	-	-	-
9 Gly	8.76	109.14	-	-	4.05 3.71	-	-	-	-	-	-	171.22	44.45	-	-	-	-	-	-
10 Thr	8.32	117.51	-	-	4.95	3.76	1.00	-	-	-	-	172.94	61.76	70.55	22.38	-	-	-	-
11 Phe	9.71	124.04	-	-	5.31	2.99 2.75	-	7.11	-	-	-	174.23	55.63	42.68	-	133.22	-	-	-
12 Lys	9.14	126.52	-	-	5.29	1.62 2.01	1.45 1.54	1.66 1.66	2.99 2.99	-	-	176.15	55.82	36.50	24.95	29.61	42.23	-	-
13 Leu	9.39	131.41	-	-	3.78	2.08 1.58	1.22	0.26 0.92	-	-	-	175.66	57.54	43.03	26.50	26.80 21.43	-	-	-
14 Glu	9.46	126.45	-	-	4.67	2.06 2.25	2.14 2.49	-	-	-	-	175.02	57.16	34.57	37.58	-	-	-	-
15 Arg	7.65	112.10	-	-	4.84	1.89 1.96	1.32 1.14	2.94 2.94	-	-	-	172.58	54.91	32.00	26.31	42.73	-	-	-
16 Asp	8.53	116.22	-	-	5.18	2.72 2.72	-	-	-	-	-	174.28	53.14	45.57	-	-	-	-	-
17 Glu	8.66	115.75	-	-	4.82	2.15 2.15	2.22 2.39	-	-	-	-	176.99	55.71	33.11	36.60	-	-	-	-
18 Asn	-	-	111.69	-	4.82	2.72 3.94	-	7.00 8.07	-	-	-	175.81	54.39	40.44	-	-	-	-	-
19 Phe	8.81	120.80	-	-	4.82	2.85 2.93	-	7.42	6.94	6.72	-	177.86	60.21	39.86	-	131.31	130.78	127.87	-
20 Asp	8.80	118.23	-	-	4.05	2.60 2.60	-	-	-	-	-	177.86	58.60	42.48	-	-	-	-	-
21 Glu	8.30	116.23	-	-	3.82	2.03 1.94	2.40 2.51	-	-	-	-	180.19	60.01	28.23	37.25	-	-	-	-
22 Tyr	7.74	123.06	-	-	3.99	3.24 2.88	-	7.42	-	-	-	175.79	62.02	38.95	-	131.31	-	-	-
23 Leu	8.40	119.73	-	-	3.58	0.96 1.85	1.17	0.44 0.14	-	-	-	179.52	57.49	42.06	26.21	26.23 22.29	-	-	-
24 Lys	8.35	118.96	-	-	3.97	1.87 1.76	1.50 1.23	1.62 1.62	2.89 2.89	-	-	180.83	59.90	32.73	25.49	29.96	41.79	-	-
25 Ala	7.97	125.42	-	-	4.11	1.59	-	-	-	-	-	179.36	55.10	17.55	-	-	-	-	-
26 Arg	8.05	118.28	-	82.14	3.58	1.52 1.19	1.25 0.88	1.93 1.93	5.62	-	-	176.45	54.49	31.93	27.67	42.84	-	-	-

27 Gly	7.50	105.72	-	-	3.52 4.01		-	-	-	-	-	174.74	45.06	-	-	-	-	-	-
28 Tyr	7.60	119.45	-	-	4.30	2.33 2.66	-	6.98	6.49	-	-	177.35	59.36	39.09	-	132.60	117.38	-	-
29 Gly	9.05	112.36	-	-	3.98 4.23	-	-	-	-	-	-	-	44.25	-	-	-	-	-	-
30 Trp	-	-	-	130.04	3.80	3.43 3.30	-	7.22	10.17 7.44	7.10 7.41	7.18	177.91	63.35	29.38	-	126.91	120.49	121.92 114.92	124.69
31 Ile	8.23	117.67	-	-	3.44	1.81	0.84 1.54 1.14	0.90	-	-	-	178.72	65.00	37.41	28.79 16.80	12.62	-	-	-
32 Met	7.81	118.31	-	-	4.41	1.90 2.15	2.60 2.76	-	2.00	-	-	178.63	56.20	31.19	32.55	-	16.05	-	-
33 Arg	8.70	117.30	-	-	3.57	1.95 0.90	1.40 1.79	2.84 3.19	-	-	-	177.94	61.38	28.86	29.22	44.26	-	-	-
34 Gln	7.43	115.95	-	112.05	3.68	1.87 1.80	1.70 1.63	-	6.71 6.47	-	-	177.46	58.46	27.95	32.76	-	-	-	-
35 Val	7.26	117.59	-	-	3.43	2.20	1.02 0.80	-	-	-	-	178.49	65.88	32.19	22.29 20.84	-	-	-	-
36 Ile	8.12	117.54	-	-	3.43	1.37	0.69 0.83 1.67	-0.03	-	-	-	178.31	65.50	38.48	18.89 29.85	14.21	-	-	-
37 Lys	8.34	117.38	-	-	4.07	1.72 1.89	1.49 1.61	1.73 1.49	2.87 2.70	-	-	177.72	59.84	32.08	25.62	29.30	41.48	-	-
38 Leu	7.33	116.09	-	-	4.28	1.57 1.75	1.75	0.85 0.82	-	-	-	177.38	55.01	42.03	27.29	22.71 24.88	-	-	-
39 Ala	7.03	122.41	-	-	4.11	1.41	-	-	-	-	-	178.55	52.89	18.35	-	-	-	-	-
40 Gly	8.36	112.05	-	-	3.67 4.26	-	-	-	-	-	-	173.58	45.15	-	-	-	-	-	-
41 Val	7.13	118.66	-	-	4.85	2.18	0.95 1.07	-	-	-	-	174.43	62.23	37.00	21.66 21.82	-	-	-	-
42 Thr	9.42	126.02	-	-	5.28	4.10	1.07	-	-	-	-	172.64	62.02	71.59	22.18	-	-	-	-
43 Lys	9.52	125.45	-	-	5.43	1.39 1.39	0.91 1.87	1.39 0.60	3.28 2.59	-	-	175.99	54.44	36.90	26.53	30.05	43.55	-	-
44 Lys	8.83	119.94	-	-	5.66	1.46 1.66	1.19 1.54	1.49	2.72	-	-	175.03	54.93	36.65	25.71	29.89	41.90	-	-
45 Phe	8.94	119.88	-	-	5.31	2.65 3.83	-	7.02	6.56	6.25	-	176.04	57.35	43.61	-	131.07	130.90	128.9	-

46 Arg	8.73	117.21	-	-	5.03	1.78 2.02	1.43 1.43	3.24 3.24	-	-	-	175.73	54.60	33.57	26.54	43.09	-	-	-
47 Asn	8.64	119.77	113.05	-	4.38	2.38 2.78	-	7.09 7.78	-	-	-	175.59	55.66	38.86	-	-	-	-	-
48 Ala	8.23	125.97	-	-	3.78	1.03	-	-	-	-	-	179.83	52.99	17.91	-	-	-	-	-
49 Ala	9.84	131.25	-	-	4.00	1.38	-	-	-	-	-	179.10	54.48	17.95	-	-	-	-	-
50 Ser	8.49	113.15	-	-	4.03	3.81 3.93	-	-	-	-	-	176.42	59.31	63.12	-	-	-	-	-
51 Gly	7.84	109.55	-	-	4.09 3.66	-	-	-	-	-	-	174.47	45.09	-	-	-	-	-	-
52 Lys	7.40	122.40	-	-	4.20	1.09 1.58	1.33 1.33	1.55 1.43	2.82 2.82	-	-	-	55.08	32.74	25.79	29.48	42.18	-	-
53 Pro	-	-	-	-	4.21	1.74 2.14	1.96 1.96	3.52 3.82	-	-	-	176.50	62.87	31.94	27.38	50.76	-	-	-
54 Asp	8.42	116.03	-	-	4.14	2.89 2.80	-	-	-	-	-	173.72	55.34	39.21	-	-	-	-	-
55 Arg	6.56	113.50	-	-	4.85	0.92 1.01	1.34 1.14	2.80 2.65	-	-	-	175.30	53.63	33.48	28.91	43.02	-	-	-
56 Tyr	8.71	120.80	-	-	4.41	-0.49 2.07	-	6.72	-	-	-	171.84	58.48	42.33	-	-	-	-	-
57 Asp	8.27	112.60	-	-	5.74	2.77 2.42	-	-	-	-	-	175.97	51.68	43.83	-	-	-	-	-
58 Met	9.49	119.63	-	-	5.55	2.13 1.81	1.95 1.65	-	1.88	-	-	174.68	54.51	37.61	33.09	-	18.95	-	-
59 Glu	9.03	123.64	-	-	4.82	1.98 1.48	1.75 1.75	-	-	-	-	175.10	55.20	34.47	37.25	-	-	-	-
60 Asn	7.53	119.70	115.38	-	5.17	3.14 2.06	-	8.43 6.37	-	-	-	173.90	53.12	41.70	-	-	-	-	-
61 Leu	9.27	123.10	-	-	5.40	1.81 1.46	1.47	0.83 0.77	-	-	-	177.57	53.06	41.48	26.92	24.01 25.86	-	-	-
62 Thr	8.72	117.38	-	-	6.01	4.58	1.37 6.74	-	-	-	-	175.39	59.41	72.73	21.83	-	-	-	-
63 Thr	8.02	109.20	-	-	4.13	4.37	1.37	-	-	-	-	174.93	64.21	68.62	23.19	-	-	-	-
64 Lys	7.57	117.27	-	-	4.53	1.43 1.71	1.26 1.26	1.61 1.61	2.81 2.93	-	-	175.37	55.08	34.79	23.83	27.67	41.82	-	-
65 Lys	7.02	119.68	-	-	4.31	1.45 1.99	1.69 1.27	1.63 1.82	3.00 2.81	-	-	173.41	56.55	34.79	24.78	29.10	42.62	-	-
66 Asp	8.61	127.29	-	-	5.99	2.87 2.45	-	-	-	-	-	177.10	52.79	43.83	-	-	-	-	-

67 Thr	9.42	110.58	-	-	4.51	4.03	1.01 4.23	-	-	-	-	174.25	60.53	71.46	22.06	-	-	-	-
68 His	8.09	121.42	-	-	4.92	3.08	-	6.46	7.59	-	-	172.61	53.98	30.95	-	121.91	138.38	-	-
69 His	9.44	125.77	168.95	-	5.43	3.39 3.55	-	13.46 7.38	7.94	-	-	175.00	53.56	29.77	-	130.23	140.54	-	-
70 Lys	9.08	125.66	-	-	5.10	1.54	1.04	1.39	2.47	-	-	176.00	55.42	35.49	24.83	29.19	41.38	-	-
71 Asp	8.98	121.22	-	-	3.90	2.56 3.01	-	-	-	-	-	175.27	55.78	39.93	-	-	-	-	-
72 Trp	8.86	118.92	-	123.62	5.06	3.73 2.33	-	6.37	7.96	6.51 6.18	-	175.47	54.26	32.43	-	127.91	-	122.38 112.95	-
73 Ala	9.12	120.64	-	-	5.22	1.48	-	-	-	-	-	179.27	49.42	22.31	-	-	-	-	-
74 Leu	9.65	124.51	-	-	4.65	1.90 1.55	1.90	0.79 0.73	-	-	-	178.74	56.02	41.26	27.43	24.05 26.04	-	-	-
75 Gly	10.08	110.79	-	-	3.51 4.25	-	-	-	-	-	-	172.90	45.47	-	-	-	-	-	-
76 Glu	7.84	121.28	-	-	4.80	2.57 1.96	2.35 2.20	-	-	-	-	174.96	55.18	32.13	36.94	-	-	-	-
77 Glu	8.89	134.43	-	-	4.76	1.84 1.91	1.72 1.85	-	-	-	-	175.39	57.17	31.91	37.85	-	-	-	-
78 Phe	8.99	125.05	-	-	5.13	3.28 3.28	-	7.35	7.06	6.62	-	171.41	55.70	41.85	-	133.40	130.70	128.4	-
79 Gln	8.81	121.02	-	112.68	5.51	1.90 1.96	1.97 2.47	-	6.89 8.05	-	-	175.29	53.89	31.10	34.46	-	-	-	-
80 Asp	9.09	124.02	-	-	5.19	2.60 3.24	-	-	-	-	-	173.60	52.71	45.77	-	-	-	-	-
81 Glu	8.35	121.39	-	-	4.34	1.91 1.91	2.55 1.96	-	-	-	-	175.02	56.42	30.58	36.95	-	-	-	-
82 Ala	8.22	129.73	-	-	4.65	0.82	-	-	-	-	-	178.56	50.48	19.80	-	-	-	-	-
83 Leu	9.25	120.57	-	-	3.66	1.24 1.72	1.82	0.79 0.82	-	-	-	176.08	57.52	42.74	27.41	24.83 26.10	-	-	-
84 Asp	7.13	113.28	-	-	4.22	2.49 3.16	-	-	-	-	-	176.34	53.39	39.72	-	-	-	-	-
85 Ser	8.29	107.42	-	-	4.27	4.41 4.12	-	-	-	-	-	173.23	60.96	60.89	-	-	-	-	-
86 Thr	8.27	112.71	-	-	4.90	4.33	1.06	-	-	-	-	173.14	59.93	71.77	21.65	-	-	-	-
87 Gln	8.57	115.36	-	114.23	4.54	2.02 1.92	2.39 2.39	-	7.90 7.03	-	-	176.66	54.97	29.23	33.54	-	-	-	-
88 His	9.41	123.00	-	-	5.45	2.78 2.78	-	7.04	8.30	-	-	174.69	52.85	35.34	-	116.06	134.68	-	-

89 Lys	9.37	119.93	-	-	4.72	1.58 1.39	1.23 1.14	-	2.81 2.81	-	-	175.83	55.30	32.55	25.23	29.26	41.94	-	-
90 Ile	8.95	128.67	-	-	4.60	-0.23	0.86 -0.73 -0.48	0.08	-	-	-	173.65	58.98	39.56	16.63 27.39	13.77	-	-	-
91 Thr	7.81	116.91	-	-	4.30	3.52	0.87	-	-	-	-	175.26	61.82	71.64	20.66	-	-	-	-
92 Phe	10.13	132.89	-	-	5.68	2.37 2.37	-	6.38	6.87	-	-	175.22	57.00	41.76	-	130.75	131.33	-	-
93 Asp	9.18	121.70	-	-	4.87	2.26 2.46	-	-	-	-	-	173.13	53.19	44.66	-	-	-	-	-
94 Leu	9.03	122.15	-	-	5.11	1.24 1.69	1.50	0.84 0.80	-	-	-	176.69	53.02	43.12	26.77	24.49 25.57	-	-	-
95 Lys	8.37	128.10	-	-	4.08	1.54 1.80	1.35 1.44	1.54 1.54	2.91 2.91	-	-	176.39	58.46	34.15	24.85	29.61	41.86	-	-
96 Asp	8.44	115.80	-	-	4.57	2.94 3.09	-	-	-	-	-	173.78	52.50	40.06	-	-	-	-	-
97 Pro	-	-	-	-	4.31	1.72 2.51	1.92 2.09	3.81 3.60	-	-	-	175.72	65.67	32.37	27.95	50.82	-	-	-
98 Asn	8.32	110.37	115.26	-	5.03	2.70 3.01	-	7.80 7.08	-	-	-	175.66	52.26	41.75	-	-	-	-	-
99 Thr	7.86	118.42	-	-	5.13	3.81	1.01	-	-	-	-	171.90	62.72	70.13	20.67	-	-	-	-
100 Leu	8.59	132.32	-	-	4.91	1.21 -0.07	1.32	0.63 -0.03	-	-	-	175.42	53.19	44.55	26.92	23.68 26.33	-	-	-
101 Thr	9.87	117.49	-	-	5.54	4.11	1.09	-	-	-	-	173.18	59.28	70.73	22.27	-	-	-	-
102 Glu	8.73	124.90	-	-	4.31	2.10 2.10	1.04 1.40	-	-	-	-	174.75	54.37	34.34	34.34	-	-	-	-
103 Thr	8.75	125.04	-	-	4.91	3.66	0.95	-	-	-	-	172.82	62.74	70.23	20.92	-	-	-	-
104 His	9.42	124.52	-	-	4.57	2.75 2.75	-	6.14	7.84	-	-	174.34	55.19	31.61	-	117.66	138.53	-	-
105 Ile	9.11	125.48	-	-	4.85	1.58	1.00 1.37 0.81	0.79	-	-	-	176.70	60.20	40.97	16.63 27.53	13.82	-	-	-
106 Lys	7.51	127.21	-	-	3.83	1.79 2.03	0.70 1.33	1.41 1.60	2.72 2.84	-	-	177.12	58.56	31.65	25.91	29.38	42.48	-	-
107 Val	7.93	125.83	-	-	3.49	1.94	0.87 0.78	-	-	-	-	177.97	66.50	31.31	23.85 20.88	-	-	-	-
108 Asp	8.82	115.40	-	-	4.49	2.51 2.78	-	-	-	-	-	176.20	55.17	40.91	-	-	-	-	-
109 Asp	6.71	112.57	-	-	4.81	2.60	-	-	-	-	-	172.60	51.82	40.68	-	-	-	-	-

						2.70													
110 Pro	-	-	-	-	4.50	1.94 2.22	1.93 2.01	3.49 3.80	-	-	-	176.50	63.92	31.68	27.01	50.31	-	-	-
111 Thr	7.58	107.03	-	-	4.31	4.35	1.21	-	-	-	-	174.66	62.64	69.09	21.75	-	-	-	-
112 Asp	8.46	127.11	-	-	4.67	2.27 3.23	-	-	-	-	-	172.45	54.48	41.13	-	-	-	-	-
113 Val	7.18	123.58	-	-	4.90	1.89	0.79 0.86	-	-	-	-	174.99	60.07	34.66	20.95 20.11	-	-	-	-
114 Glu	8.75	127.37	-	-	4.87	1.82 1.99	2.26 2.85	-	-	-	-	173.67	55.78	33.68	36.88	-	-	-	-
115 Thr	8.92	122.88	-	-	4.88	3.83	1.13	-	-	-	-	174.09	62.12	71.36	22.79	-	-	-	-
116 Tyr	9.14	130.62	-	-	5.26	2.79 2.79	-	6.95	6.37	-	-	175.48	52.83	39.05	-	131.94	117.52	-	-
117 Glu	8.38	119.49	-	-	5.06	1.89 1.76	2.26 2.26	-	-	-	-	174.86	54.83	33.53	36.57	-	-	-	-
118 Tyr	10.02	122.14	-	-	5.75	2.89 2.67	-	6.77	7.10	-	-	174.94	56.92	41.24	-	132.32	117.51	-	-
119 Arg	8.86	118.11	-	-	5.17	1.94 1.68	1.52 1.97	3.07 3.13	-	-	-	175.31	54.37	35.16	27.85	43.45	-	-	-
120 Arg	9.44	120.89	-	79.74	5.17	1.38 1.71	0.86 1.08	3.02 3.15	6.63	-	-	176.00	52.61	29.72	26.17	40.52	-	-	-
121 Asp	8.59	124.29	-	-	4.80	2.41 2.80	-	-	-	-	-	176.21	53.46	43.14	-	-	-	-	-
122 Gly	9.01	116.08	-	-	4.14 3.81	-	-	-	-	-	-	-	47.05	-	-	-	-	-	-
123 Asp	9.54	128.68	-	-	4.68	2.27 2.96	-	-	-	-	-	173.15	55.40	40.85	-	-	-	-	-
124 Tyr	8.38	115.11	-	-	5.41	2.88 3.29	-	7.14	6.86	-	-	176.88	58.10	40.67	-	133.13	117.96	-	-
125 Leu	10.02	127.76	-	-	4.77	0.42 1.69	1.30	0.23 0.50	-	-	-	174.33	54.35	44.80	26.78	25.50 23.56	-	-	-
126 Val	9.73	129.47	-	-	4.77	1.86	0.32 0.83	-	-	-	-	175.30	61.17	33.11	20.45 21.71	-	-	-	-
127 Met	9.43	129.99	-	-	5.23	2.05 1.54	1.03 1.64	-	1.41	-	-	173.91	53.43	37.01	32.39	-	18.43	-	-
128 Lys	9.50	128.81	-	-	5.43	1.61 1.70	1.20 1.43	1.54 1.54	2.81 2.81	-	-	176.60	54.56	35.74	24.94	29.70	-	-	-
129 Met	8.43	124.54	-	-	5.11	1.96 0.95	1.70 1.85	-	1.40	-	-	174.95	53.85	35.61	32.01	-	17.89	-	-

130 Ser	10.18	117.22	-	-	5.71	3.65 3.76	-	-	-	-	-	173.14	57.52	65.70	-	-	-	-	-
131 Trp	9.17	126.63	-	127.40	4.96	2.81 3.38	-	6.54	7.99 10.07	7.34 7.41	7.21	174.79	56.98	33.50	-	125.48	120.91	122.79 114.70	126.11
132 Lys	8.50	123.26	-	-	3.46	1.57 1.82	0.61 0.61	1.49 1.49	2.75 2.86	-	-	176.42	57.04	30.15	25.01	29.17	42.37	-	-
133 Gly	8.53	103.59	-	-	4.11 3.50	-	-	-	-	-	-	174.20	45.23	-	-	-	-	-	-
134 Val	8.17	124.66	-	-	4.20	2.33	0.91 0.95	-	-	-	-	174.95	62.62	32.56	21.36 21.11	-	-	-	-
135 Ser	8.69	120.83	-	-	5.89	3.81 3.76	-	-	-	-	-	173.14	56.75	66.07	-	-	-	-	-
136 Thr	9.02	119.11	-	-	5.09	4.14	4.39 0.77	-	-	-	-	171.84	59.03	70.55	21.28	-	-	-	-
137 Ser	7.42	120.24	-	-	5.55	3.15 3.62	-	-	-	-	-	172.51	57.35	66.37	-	-	-	-	-
138 Arg	9.29	121.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	173.30	54.36	40.21	-	-	-	-	-
139 Tyr	8.77	120.37	-	-	4.75	2.82 2.50	-	6.53	6.48	-	-	174.67	58.35	39.39	-	132.63	118.21	-	-
140 Tyr	9.80	124.20	-	-	5.14	3.47 2.63	-	7.13	6.53	-	-	175.21	55.66	40.42	-	133.12	118.71	-	-
141 Lys	9.43	129.06	-	-	4.13	1.71 1.94	0.82 1.51	1.54 1.47	2.91 2.91	-	-	177.33	56.14	34.31	24.65	28.35	42.39	-	-
142 Lys	9.19	133.29	-	-	4.21	1.59 1.83	0.76	-	3.02 2.94	-	-	175.31	58.64	33.00	24.99	29.17	42.78	-	-
143 Gln	8.66	132.20	-	115.55	4.14	1.64 2.17	2.33 2.19	-	7.47 7.06	-	-	180.99	55.93	31.15	34.97	-	-	-	-

Apéndice B - Asignación de las resonancias de OLA

OLA	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
	-	41.01	30.33	32.78	-	32.75	32.72	29.35	-	133.52	28.86	31.26	30.96	31.73	32.45	34.28	25.44	17.36
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18
	-	1.84 1.84	1.39 1.39	1.20 1.20	-	1.20 1.20	1.21 1.34	1.81 1.81	5.17	5.17	1.84 1.84	1.15 1.24	0.92 1.01	1.01 1.01	1.21 1.21	1.04 1.11	1.19 1.24	0.83

Apéndice C - Introducción de la molécula del ligando OLA al Cálculo

Archivos de Topología para la Molécula de OLA

Remarks ola.par

Remarks Created by Marina Ibanez and Brian Smith

Remarks with the help of XPLO2D from file 2fljOLA.pdb and
reference to parallhdg5.3.pro

Remarks vinyl parameters from Kitagawa & Matsuura (1997) J Phys
Chem B 101, 1803

Remarks Parameters for residue type OLA

```

set echo=false end

{ Note: edit if necessary }
BOND  C      OC      1000.000 {sd=      0.001}      1.249
BOND  C      CH2E     1000.000 {sd=      0.001}      1.516
BOND  CH2E CH2E     1000.000 {sd=      0.001}      1.520
BOND  CH2E CH3E     1000.000 {sd=      0.001}      1.513
BOND  CH2E HA       1000.000 {sd=      0.001}      1.080
BOND  CH3E HA       1000.000 {sd=      0.001}      1.080
BOND  CV      HA      1000.000 {sd=      0.001}      1.080
BOND  CV      CH2E    1000.000 {sd=      0.001}      1.497 !J Phys
Chem B 101 1803
BOND  CV      CV      1000.000 {sd=      0.001}      1.302 !J Phys
Chem B 101 1803

{ Note: edit if necessary }
ANGLE OC      C      OC      500.00 {sd=      0.031}      123.3548
ANGLE CH2E C      OC      500.00 {sd=      0.031}      118.4969
ANGLE C      CH2E CH2E     500.00 {sd=      0.031}      112.5943
ANGLE CH2E CH2E CH2E     500.00 {sd=      0.031}      111.3121
ANGLE CH2E CH2E CH3E     500.00 {sd=      0.031}      113.7404
ANGLE C      CH2E HA      500.00 {sd=      0.031}      108.5877
ANGLE CH2E CH2E HA      500.00 {sd=      0.031}      108.7236
ANGLE CH2E CH3E HA      500.00 {sd=      0.031}      109.4694
ANGLE HA      CH3E HA      500.00 {sd=      0.031}      109.4703
ANGLE HA      CH2E HA      500.00 {sd=      0.031}      109.4074
ANGLE CH3E CH2E HA      500.00 {sd=      0.031}      108.0408
ANGLE CH2E CV      CV      500.00 {sd=      0.031}      124.8775 !J
Phys Chem B 101 1803
ANGLE CH2E CH2E CV      500.00 {sd=      0.031}      115.70 !J
Phys Chem B 101 1803
ANGLE CV      CH2E HA      500.00 {sd=      0.031}      108.7236
ANGLE CH2E CV      HA      500.00 {sd=      0.031}      115.1792
!MI & BOS
ANGLE CV      CV      HA      500.00 {sd=      0.031}      119.9433

{ Note: edit if necessary }

DIHEdral OC      C      CH2E CH2E  MULT 2 1.00      2 0.0000 0.5
6 0.0000 !Glu
DIHEdral C      CH2E CH2E CH2E  2.00      3 0.0000

```

```

DIHEdral  CH2E CH2E CH2E CH2E    2.00    3  0.0000
DIHEdral  CH2E CH2E CH2E CH3E    2.00    3  0.0000
DIHEdral  CH2E CH2E CH2E CV      2.00    3  0.0000
DIHEdral  CH2E CH2E CV    CV      2.00    3  0.0000

{ Note: edit if necessary }

IMPRoper  C    CH2E OC    OC      500.00 {sd=    0.031}    0
-0.0137
IMPRoper  C    CH2E HA    HA      500.00 {sd=    0.031}    0
-70.4459
IMPRoper  CH2E CH2E HA    HA      500.00 {sd=    0.031}    0
-70.7825
IMPRoper  CH3E CH2E HA    HA      500.00 {sd=    0.031}    0
-70.1069
IMPRoper  CH2E CV    CV    HA      500.00 {sd=    0.031}    0
179.9935 !vinyl
IMPRoper  CH2E CV    CV    CH2E    500.00 {sd=    0.031}    0
-0.0034 !cis vinyl
IMPRoper  CV    CH2E HA    HA      500.00 {sd=    0.031}    0
-70.7825

{ Note: edit if necessary }
if ($par_nonbonded eq "PROLSQ") then
{* nonbonding parameter section *}
{* ===== *}
!!
!   This uses a new form of the REPEL function:
!       fVDW(R) =  RCON *( Rmin ^ IREX - R ^ IREX ) ^ REXP
!
!   PROLSQ uses a function of the form:
!       fVDW(R) =  (1 / 0.5) ^ 4 * ( Rmin ^ 4 - R ^ 4 )
!
!   The epsilon values are arbitrary since the repel function
does not depend
!   on epsilon.  The sigma values come from converting the Van
der Waals
!   radii of the PROLSQ program into sigma values using the
formula:
!       Rmin = sigma * 2 ^ (1/6)
!   Note:  Prolsq decrements Van der Waals radii for non-bonded
contacts
!           that involve torsion angles (1:4 contacts) by .30 A,
and
!           hydrogen bonds (X...Y) by .2 A (X-H...Y) by .9.  The
former
!           decrement is accomplished in CNS by using the
!           1-4 nonbonded terms.  The latter decrement is
accomplished by
!           decreasing the van der Waals radius of hydrogens by
0.8
!           and that of O and N by 0.1 A.
!
{ suggested values:
  NBONds
    CUTNB=7.0    WMIN=1.5

```

```

    REPEL = 1.0
    REXponent = 4
    IREXponent = 1
    RCONst = 16.0
    TOLerance = 0.5      NBXMOD = 5
    ctonnb=5.5 ctofnb=6.0 { * for consistency only, not needed
for repel *}
    END
}
evaluate ($repel_radius = 1.0)
evaluate ($repel_rcons = 25)
evaluate ($repel_rexpo = 4)
evaluate ($repel_irexp = 1)
!
!               type          van der Waals radius
correction applied for hbond
evaluate ($VR_C=      3.7)
evaluate ($VR_O=      2.9)                                {-0.1}
evaluate ($VR_H=      2.0) {from 1.6 02-APRIL-00}
evaluate ($VR_C_SP2=   3.4)

{ convert radii into sigmas }
!
! sigma= vdw radius / 2 ^ (1/6)
!
evaluate ($VR_C   = $VR_C   / 2^(1/6))
evaluate ($VR_O   = $VR_O   / 2^(1/6))
evaluate ($VR_H   = $VR_H   / 2^(1/6))
evaluate ($VR_C_SP2=$VR_C_SP2/ 2^(1/6))

{ compute 1-4 sigmas from reduced radii}
evaluate ($VR14_C   = $VR_C   - (0.3/ 2^(1/6)))
evaluate ($VR14_O   = $VR_O   - (0.3/ 2^(1/6)))
evaluate ($VR14_H   = $VR_H   - (0.3/ 2^(1/6)))
evaluate ($VR14_C_SP2=$VR_C_SP2- (0.3/ 2^(1/6)))

evaluate ($VE=0.1)
!
!               eps          sigma          eps(1:4)
sigma(1:4)
!               (kcal/mol) (A)               (kcal/mol) (A)
!               -----
-----
NONBonded  HA      $VE $VR_H      $VE $VR14_H      ! aliphatic
hydrogen
NONBonded  C       $VE $VR_C_SP2    $VE $VR14_C_SP2 ! carbonyl
carbon
NONBonded  CH2E    $VE $VR_C      $VE $VR14_C      ! extended
carbons
NONBonded  CH3E    $VE $VR_C      $VE $VR14_C      ! /
NONBonded  CV      $VE $VR_C      $VE $VR14_C      ! vinyl
carbons
NONBonded  OC      $VE $VR_O      $VE $VR14_O

elseif ($par_nonbonded eq "OPLSX") then

```

```

! these are close to the original OPLS parameters without
introducing
! new atom types. The commented out lines are for atom types
that
! are unique in OPLS but would require additional atom types in
! allhdg. Michael Nilges.
{ suggested values for refinement in H2O
  NBONds
    CUTNB=12    WMIN=1.5
    REPEl = 0.0      cdie shift
    TOLerance = 0.5      NBXMOD = 5
    ctonnb=5.5 ctofnb=11.0
  END
}
NONBonded  C      0.105  3.750      0.013  3.750  {OPLS
C)!
NONBonded  OC     0.210  2.960      0.021  2.960
NONBonded  CH2E   0.118  3.905      0.015  3.905  {OPLS
C2J}
NONBonded  CH3E   0.160  3.910      0.020  3.910  {OPLS
C3J}
NONBonded  CV     0.110  3.750      0.014  3.750  {}!
NONBonded  HA     0.05   0.50       0.004  0.50

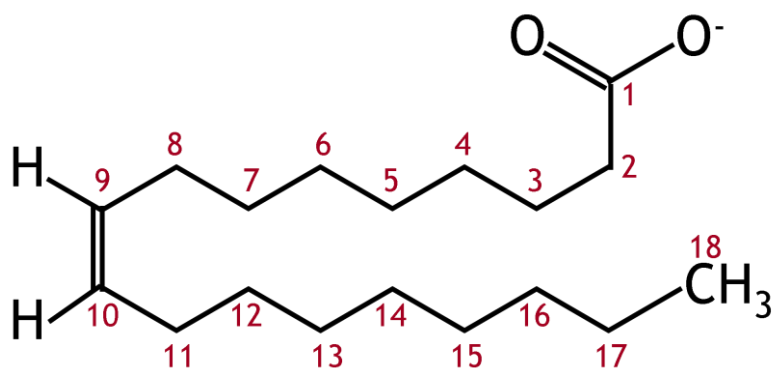
NBFIX      HA  HA   1846.41    5.76501    1846.41    5.76501

else {standard PARALLHDG parameters}
{ suggested values:
  NBONds
    CUTNB=7.0    WMIN=1.5
    REPEl = 0.78
    REXponent = 2
    IREXponent = 2
    RCONst = 5.0
    TOLerance = 0.5      NBXMOD = 5
    ctonnb=5.5 ctofnb=6.0 {* for consistency only, not needed for
repel *}
  END
}
evaluate ($repel_radius = 0.78)
evaluate ($repel_rcons = 5.0)
evaluate ($repel_rexpo = 2)
evaluate ($repel_irexp = 2)
NONBonded  C      0.0903  3.3409      0.0903  3.3409
NONBonded  CV     0.1200  3.3409      0.1200  3.3409
NONBonded  CH2E   0.0903  3.3409      0.0903  3.3409
NONBonded  CH3E   0.0903  3.3409      0.0903  3.3409
NONBonded  OC     1.0244  2.7755      1.0244  2.7755
NONBonded  HA     0.0045  2.2272      0.0045  2.2272

end if
set echo=true end

```

Restricciones No Ambiguas OLA:As-p18



As-p18		OLA	
Residuo y Núcleo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Residuo y Núcleo	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
36 Ile H $_{\delta 1}^*$	-0.03	1001 H9	5.167
36 Ile H $_{\alpha}$	3.43	1001 H9	5.167
36 Ile H $_{\gamma 2}^*$	0.83	1001 H9	5.167
32 Met H $_{\epsilon}^*$	2.00	1001 H10	5.167
36 Ile H $_{\delta 1}^*$	-0.03	1001 H10	5.167
32 Met H $_{\epsilon}^*$	2.00	1001 H12 ₁	1.152
84 Asp H $_{\alpha}$	4.22	1001 H12 ₂	1.235
36 Ile H $_{\delta 1}^*$	-0.03	1001 H16 ₂	1.108
28 Tyr H $_{\epsilon}^*$	6.49	1001 H18*	0.832
19 Phe H $_{\epsilon}^*$	6.94	1001 H18*	0.832
36 Ile H $_{\alpha}$	3.43	1001 H18*	0.832
23 Leu H $_{\alpha}$	3.58	1001 H18*	0.832
36 Ile H $_{\delta 1}^*$	-0.03	1001 H18*	0.832
23 Leu H $_{\delta 1}^*$	0.44	1001 H18*	0.832
19 Phe H $_{\zeta}$	6.72	1001 H18*	0.832
23 Leu H $_{\delta 2}^*$	0.14	1001 H18*	0.832

Apéndice D – Intensidad de Picos NH en Espectros ^{15}N -HSQC para As-p18 en sus Formas Apo y Holo

Residuo	Intensidad Apo	Intensidad Holo	I_A/I_H
1 Lys	2.83E+06	2.36E+06	1.20
2 Thr	5.16E+06	4.70E+06	1.10
3 Leu	2.99E+06	2.92E+06	1.02
4 Pro			
5 Asp	4.63E+06	3.87E+06	1.20
6 Lys	2.81E+06	2.43E+06	1.16
7 Phe	3.35E+06	3.06E+06	1.10
8 Leu	3.81E+06	3.48E+06	1.10
9 Gly	3.65E+06	3.23E+06	1.13
10 Thr	3.59E+06	3.93E+06	0.91
11 Phe	2.49E+06	3.09E+06	0.81
12 Lys	2.95E+06	2.96E+06	1.00
13 Leu	1.40E+06	1.32E+06	1.05
14 Glu	1.92E+06	2.15E+06	0.89
15 Arg	2.69E+06	3.24E+06	0.83
16 Asp	3.58E+06	3.45E+06	1.04
17 Glu	1.71E+06	2.77E+06	0.62
18 Asn			
19 Phe	3.10E+06	4.09E+06	0.76
20 Asp	3.23E+06	2.45E+06	1.32
21 Glu	-	4.31E+06	
22 Tyr	1.59E+06	2.95E+06	0.54
23 Leu	4.18E+06	2.83E+06	1.48
24 Lys	1.28E+06	3.57E+06	0.36
25 Ala		4.27E+06	
26 Arg	2.86E+05	3.34E+06	0.09
27 Gly	1.47E+06	3.63E+06	0.40
28 Tyr	1.55E+05	3.87E+06	0.04
29 Gly	-	1.70E+06	
30 Trp			
31 Ile	-	3.71E+06	
32 Met	-	3.60E+06	
33 Arg	3.28E+06	1.00E+06	3.28
34 Gln	-	3.83E+06	
35 Val	1.60E+06	3.31E+06	0.48
36 Ile	-	2.57E+06	
37 Lys	-	3.34E+06	
38 Leu	-	3.25E+06	
39 Ala	-	3.57E+06	
40 Gly	-	2.62E+06	
41 Val	-	2.88E+06	
42 Thr	-	2.64E+06	
43 Lys	1.68E+06	2.71E+06	0.62
44 Lys	5.46E+06	2.80E+06	1.95
45 Phe	2.67E+06	3.01E+06	0.89
46 Arg	3.00E+06	6.59E+06	0.46
47 Asn	4.02E+06	3.44E+06	1.17
48 Ala	3.04E+06	2.69E+06	1.13
49 Ala	3.23E+06	2.93E+06	1.10
50 Ser	4.04E+06	3.50E+06	1.16
51 Gly	3.96E+06	3.38E+06	1.17
52 Lys	3.59E+06	3.08E+06	1.17

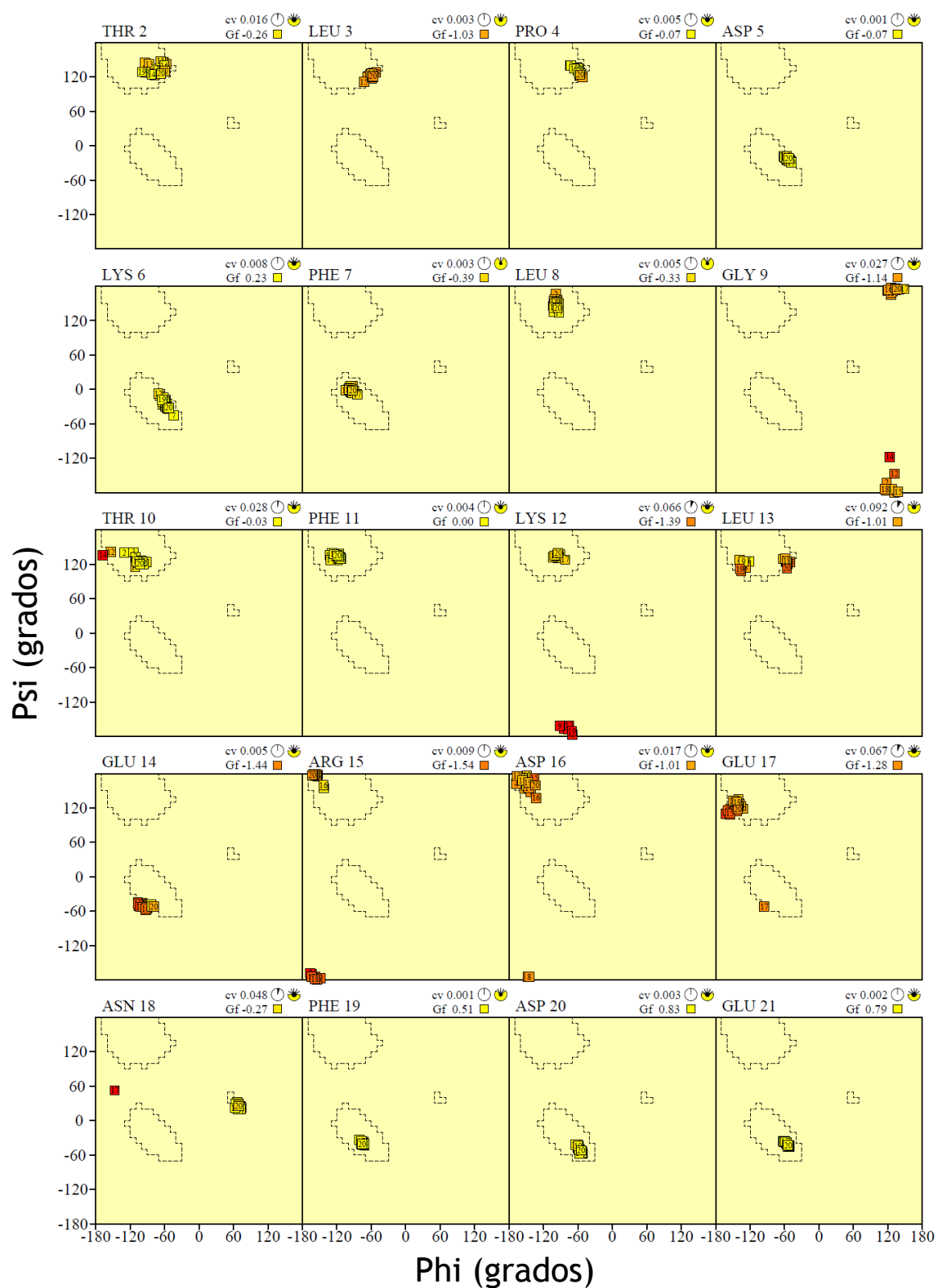
Residuo	Intensidad Apo	Intensidad Holo	I_A/I_H
53 Pro			
54 Asp	4.79E+06	5.00E+06	0.96
55 Arg	3.48E+06	2.87E+06	1.21
56 Tyr	4.84E+06	6.38E+06	0.76
57 Asp	3.13E+06	3.47E+06	0.90
58 Met	2.34E+06	2.32E+06	1.01
59 Glu	2.82E+06	2.44E+06	1.16
60 Asn	8.36E+05	2.10E+06	0.40
61 Leu	-	3.20E+06	
62 Thr	-	3.58E+06	
63 Thr	-	2.57E+06	
64 Lys	-	2.78E+06	
65 Lys	3.76E+05	2.63E+06	0.14
66 Asp	2.55E+06	3.39E+06	0.75
67 Thr	2.73E+05	3.13E+06	0.09
68 His	1.94E+06	2.84E+06	0.68
69 His	1.50E+06	2.51E+06	0.60
70 Lys	3.24E+06	3.50E+06	0.93
71 Asp	2.36E+06	2.20E+06	1.07
72 Trp	4.01E+06	4.06E+06	0.99
73 Ala	3.25E+06	2.95E+06	1.10
74 Leu	3.32E+06	2.83E+06	1.17
75 Gly	2.73E+06	2.44E+06	1.12
76 Glu	4.82E+06	4.07E+06	1.18
77 Glu	3.27E+06	2.87E+06	1.14
78 Phe	3.47E+06	2.76E+06	1.26
79 Gln	3.66E+06	3.12E+06	1.17
80 Asp	3.30E+06	2.67E+06	1.24
81 Glu	1.07E+06	2.81E+06	0.38
82 Ala	2.30E+06	2.56E+06	0.90
83 Leu	1.31E+06	2.02E+06	0.65
84 Asp	1.51E+06	4.21E+06	0.36
85 Ser	2.60E+06	3.31E+06	0.79
86 Thr	3.09E+06	5.18E+06	0.60
87 Gln	3.19E+06	2.91E+06	1.10
88 His	2.85E+06	2.71E+06	1.05
89 Lys	2.72E+06	2.48E+06	1.10
90 Ile	2.91E+06	2.56E+06	1.14
91 Thr	3.27E+06	2.75E+06	1.19
92 Phe	2.41E+06	2.27E+06	1.06
93 Asp	3.55E+06	3.42E+06	1.04
94 Leu	4.64E+06	3.34E+06	1.39
95 Lys	3.43E+06	2.88E+06	1.19
96 Asp	5.55E+06	5.00E+06	1.11
97 Pro			
98 Asn	4.11E+06	3.86E+06	1.06
99 Thr	3.93E+06	3.75E+06	1.05
100 Leu	2.87E+06	2.66E+06	1.08
101 Thr	3.22E+06	2.91E+06	1.11
102 Glu	2.18E+06	3.04E+06	0.72
103 Thr	3.14E+06	3.46E+06	0.91
104 His	2.85E+06	2.77E+06	1.03

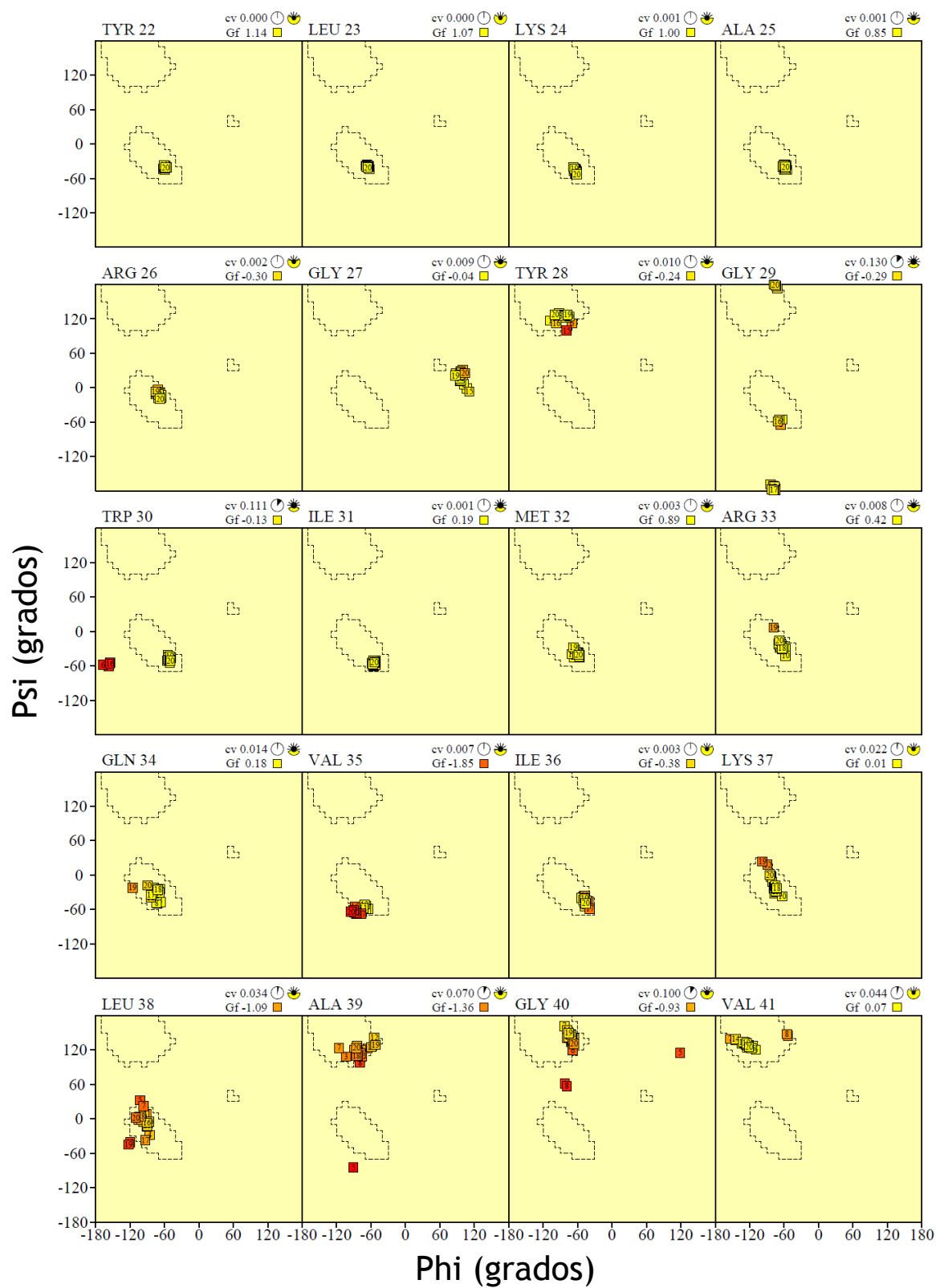
Residuo	Intensidad Apo	Intensidad Holo	I_A/I_H
105 Ile	3.24E+06	4.33E+06	0.75
106 Lys	2.28E+06	2.80E+06	0.81
107 Val	3.26E+06	2.83E+06	1.15
108 Asp	3.58E+06	4.20E+06	0.85
109 Asp	3.37E+06	3.69E+06	0.92
110 Pro			
111 Thr	4.28E+06	3.81E+06	1.12
112 Asp	3.69E+06	3.86E+06	0.96
113 Val	2.90E+06	3.13E+06	0.93
114 Glu	3.66E+06	3.54E+06	1.03
115 Thr	2.67E+06	3.47E+06	0.77
116 Tyr	2.85E+06	3.07E+06	0.93
117 Glu	4.05E+06	2.60E+06	1.56
118 Tyr	2.27E+06	2.64E+06	0.86
119 Arg	2.94E+06	2.69E+06	1.09
120 Arg	3.08E+06	3.13E+06	0.98
121 Asp	3.61E+06	3.16E+06	1.14
122 Gly	3.62E+05	2.81E+05	1.29
123 Asp			
124 Tyr	4.03E+06	3.77E+06	1.07

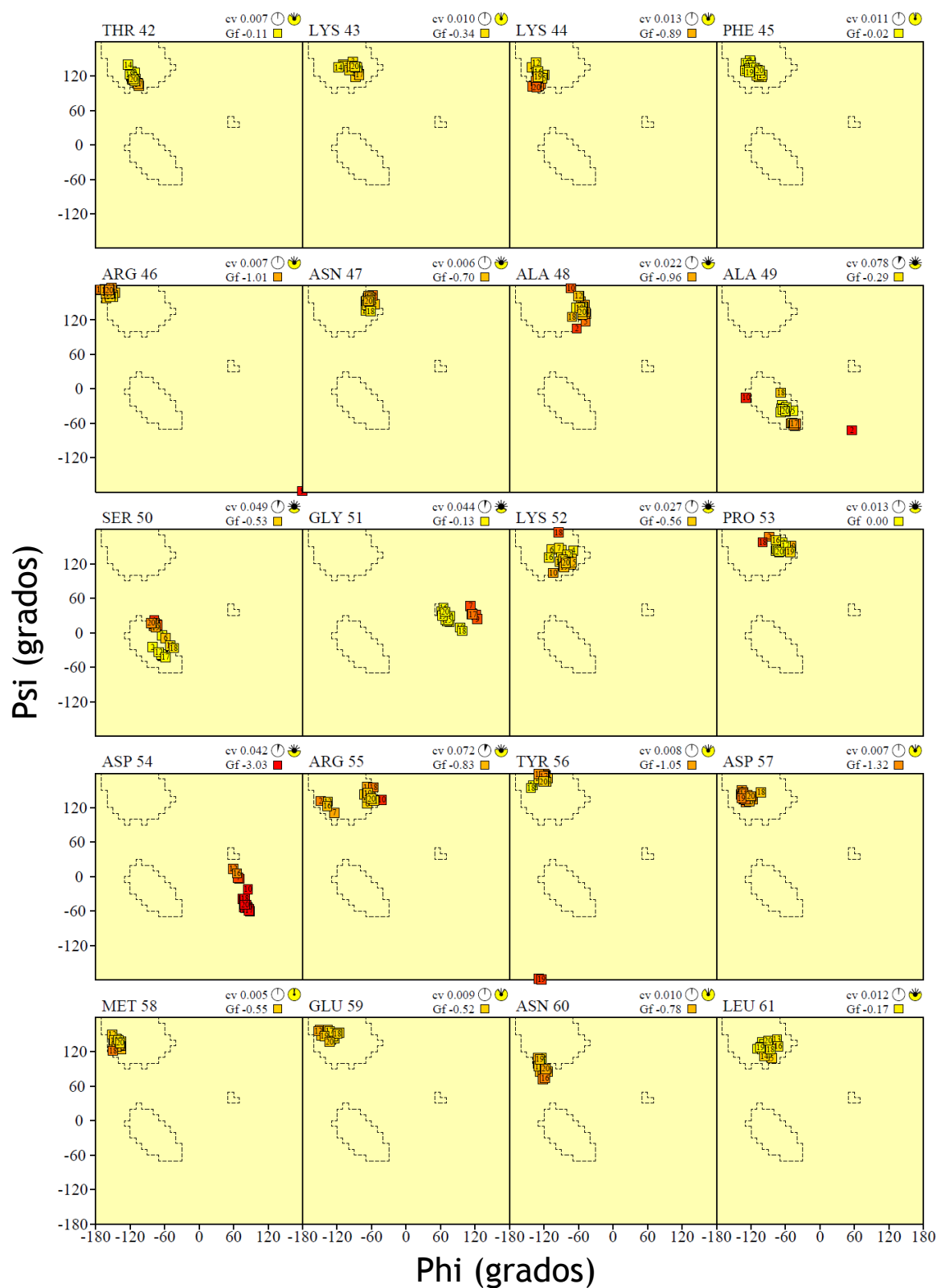
Residuo	Intensidad Apo	Intensidad Holo	I_A/I_H
125 Leu	4.00E+06	2.18E+06	1.83
126 Val	2.85E+06	2.96E+06	0.96
127 Met	1.75E+06	1.98E+06	0.88
128 Lys	2.37E+06	2.87E+06	0.83
129 Met	2.54E+06	1.04E+06	2.45
130 Ser	1.45E+06	2.81E+06	0.52
131 Trp	3.51E+06	3.60E+06	0.98
132 Lys	2.14E+06	3.18E+06	0.67
133 Gly	3.39E+06	3.54E+06	0.96
134 Val	4.13E+06	4.32E+06	0.96
135 Ser	4.72E+06	-	
136 Thr	2.02E+06	3.06E+06	0.66
137 Ser	2.13E+06	2.65E+06	0.80
138 Arg	2.23E+06	5.04E+05	4.42
139 Tyr			
140 Tyr	1.97E+06	2.08E+06	0.95
141 Lys	2.60E+06	2.67E+06	0.98
142 Lys	2.34E+06	2.33E+06	1.00
143 Gln	3.24E+06	3.01E+06	1.08

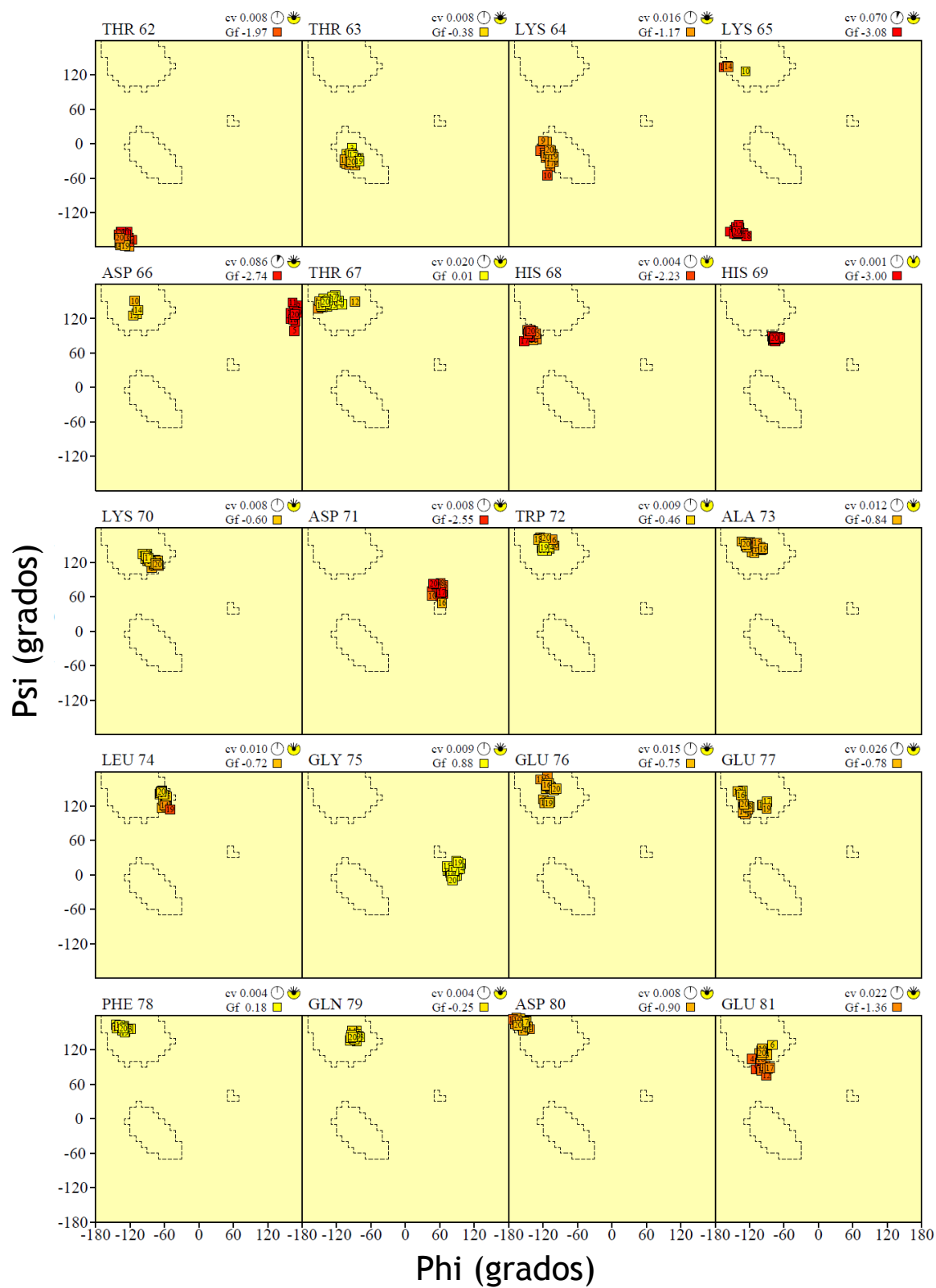
Apéndice E – Análisis del *Ensemble* de As-p18 por PROCHECK-NMR

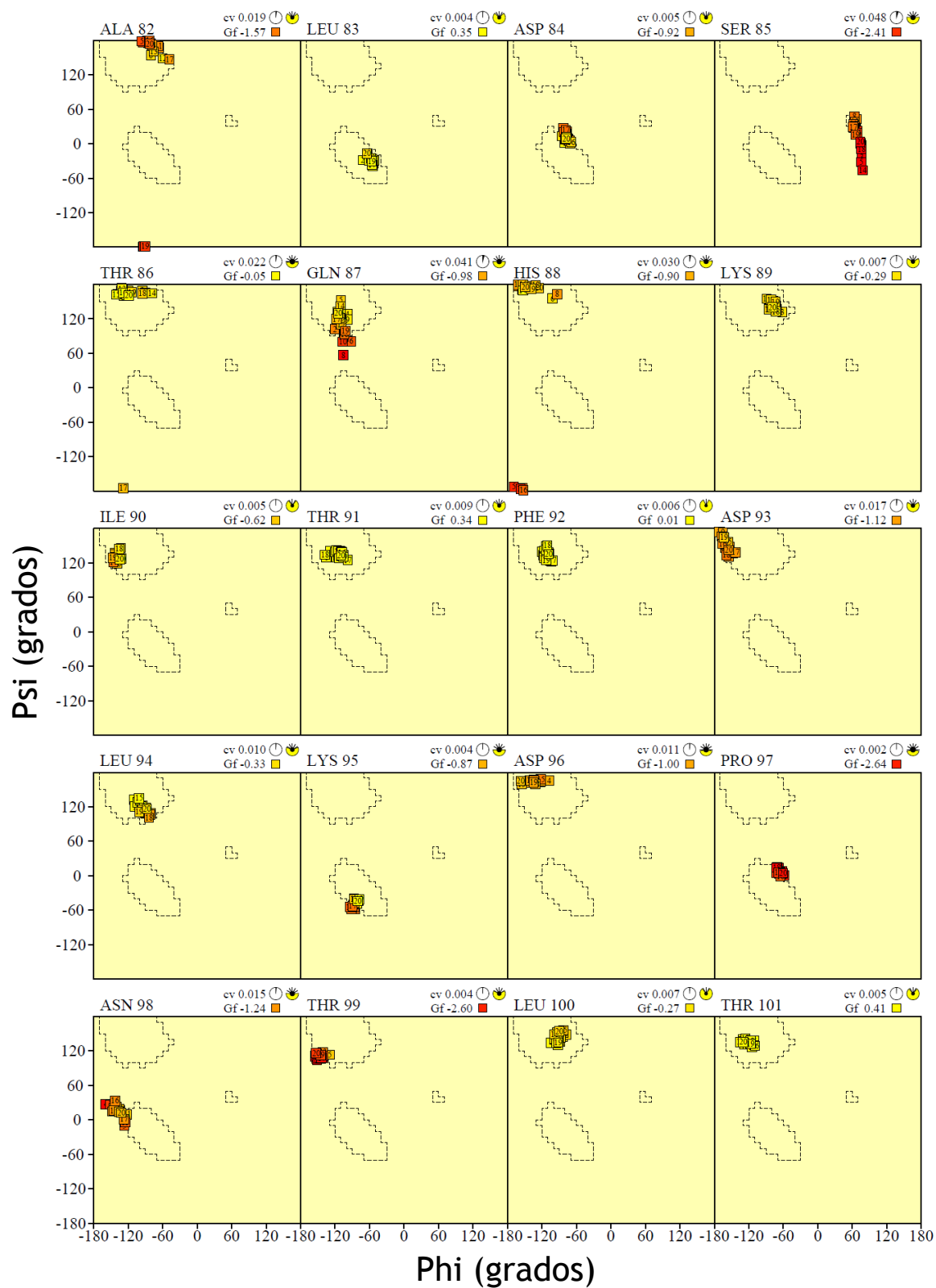
Gráficos de Ramachandran (20 modelos)











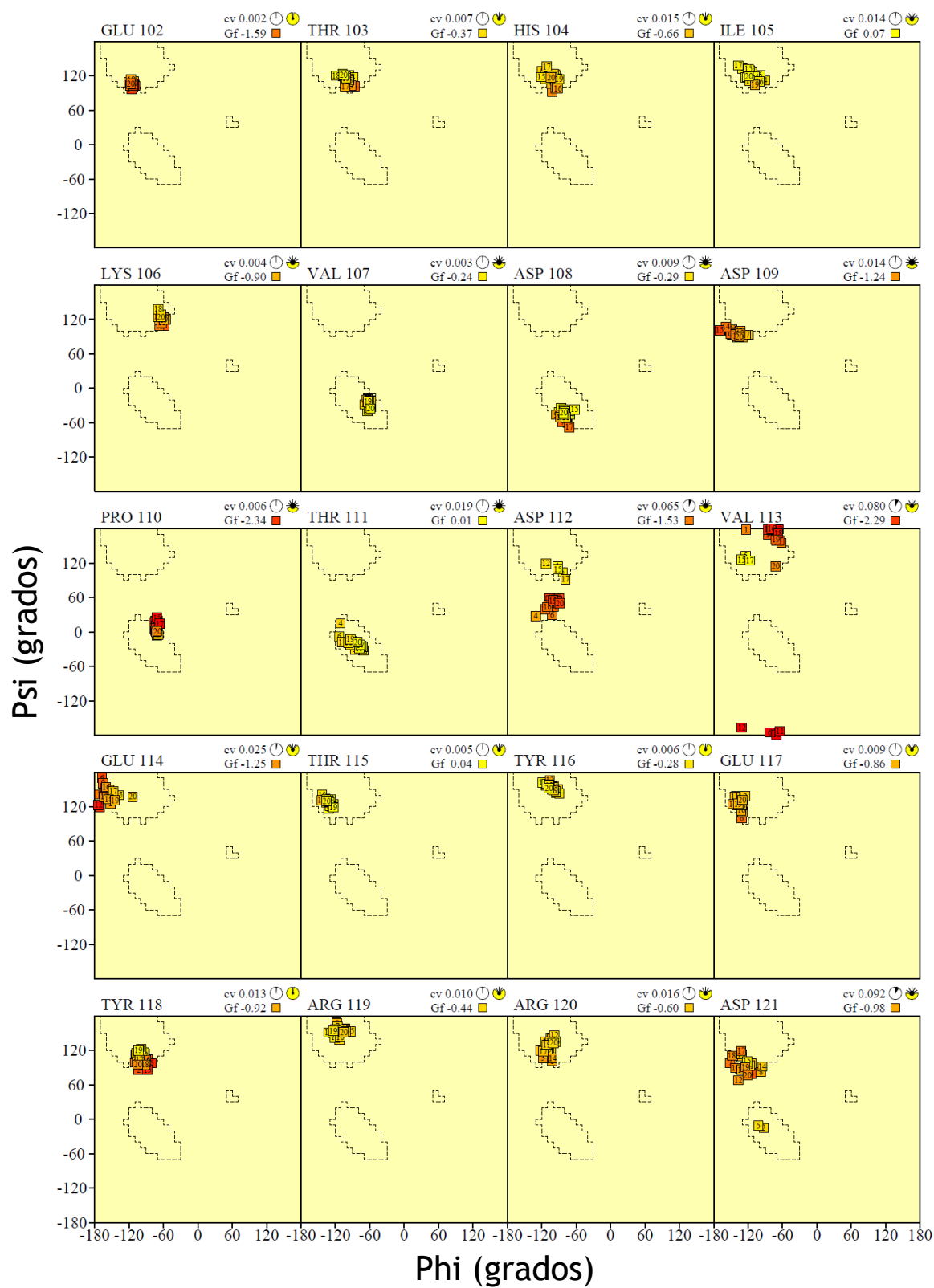
cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points).

☀ Accessible

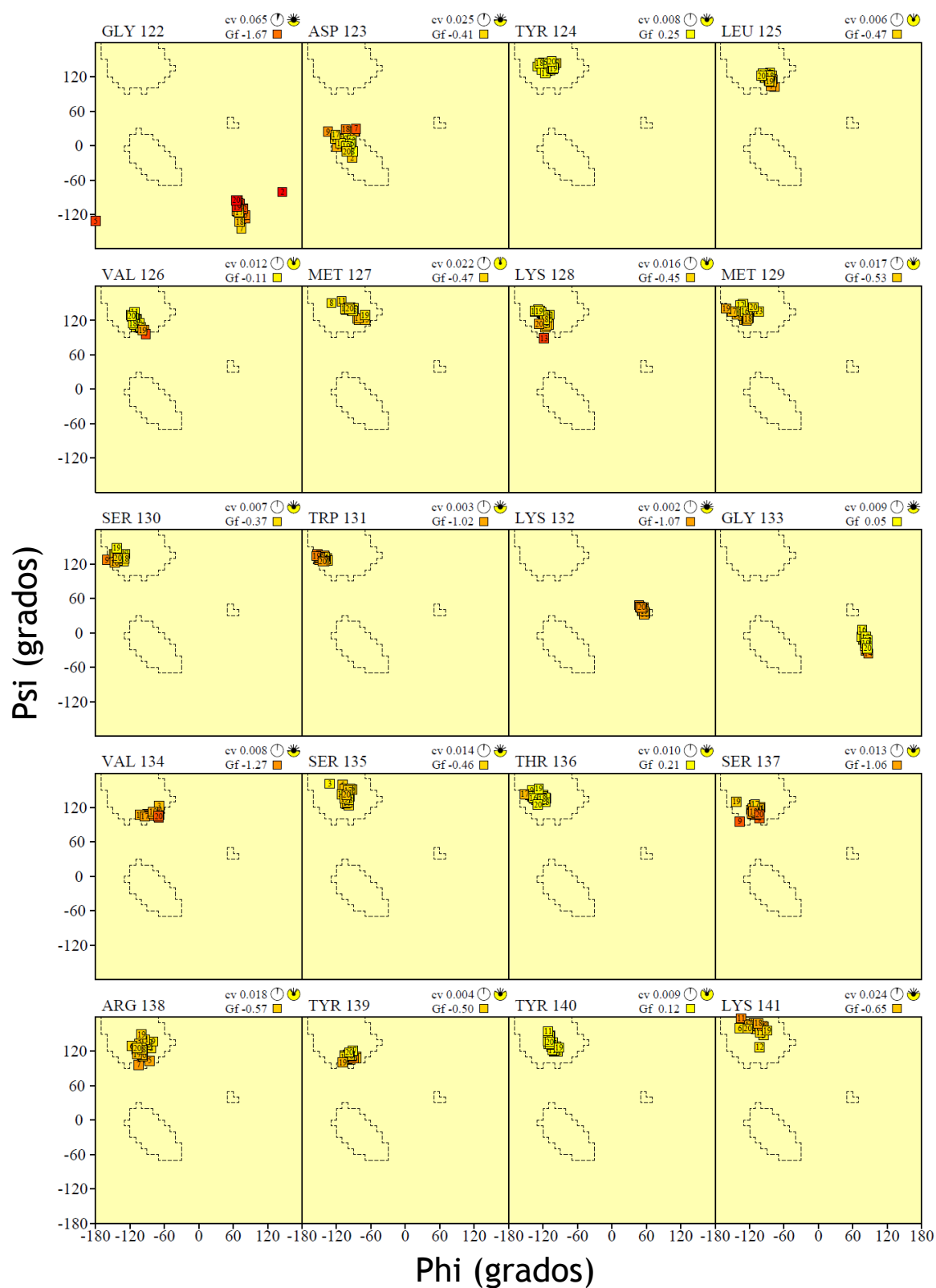
☀ Buried

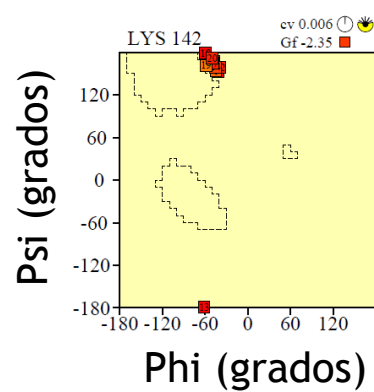
Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformations) based on analysis of high-res. Xstal structures

Data points coloured according to G-factor: Favourable Unfavourable




cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). ☀ Accessible ☾ Buried
 Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformations) based on analysis of high-res. Xstal structures
 Data points coloured according to G-factor: Favourable Unfavourable





cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points).

 Accessible

 Buried

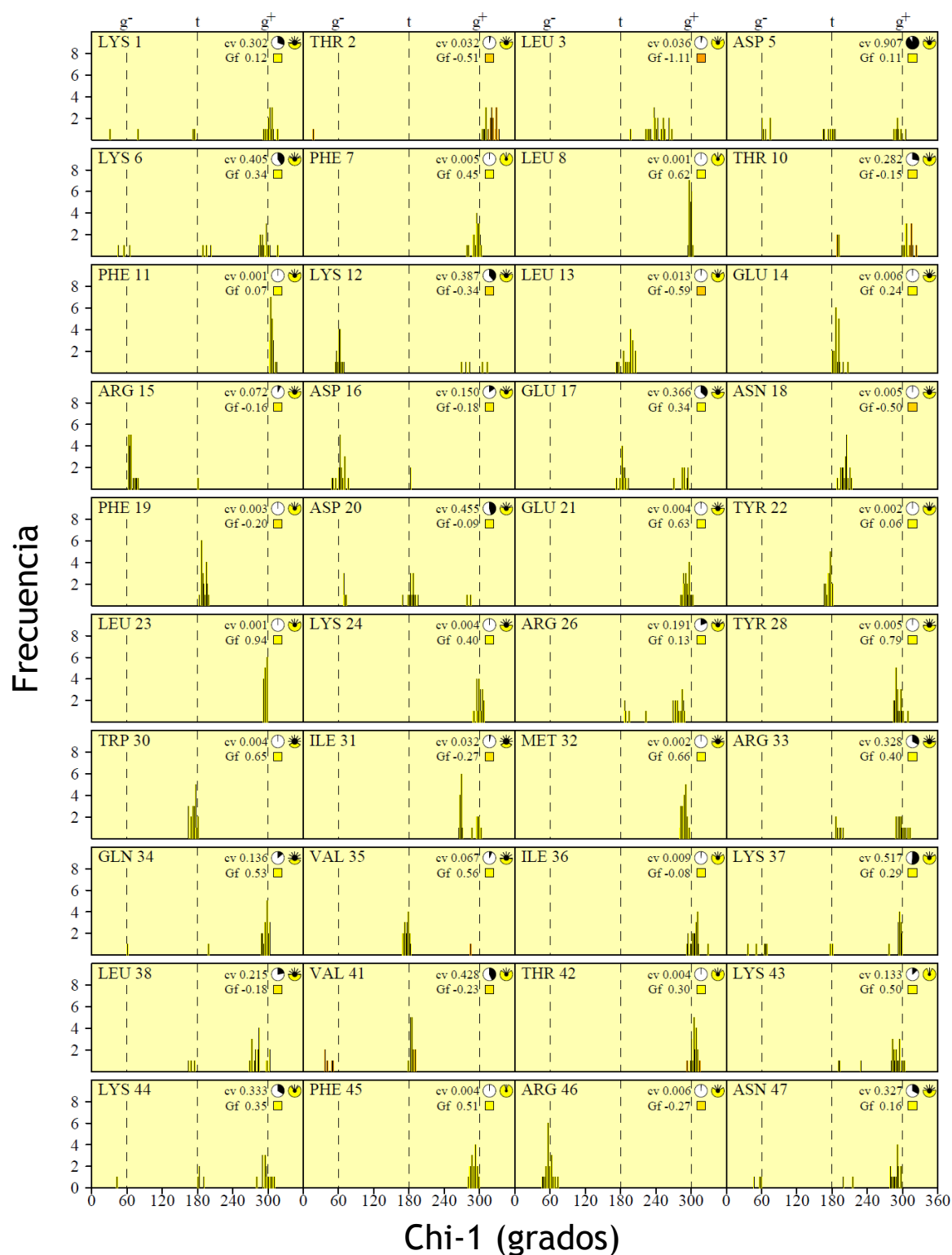
Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformations) based on analysis of high-res. Xstal structures

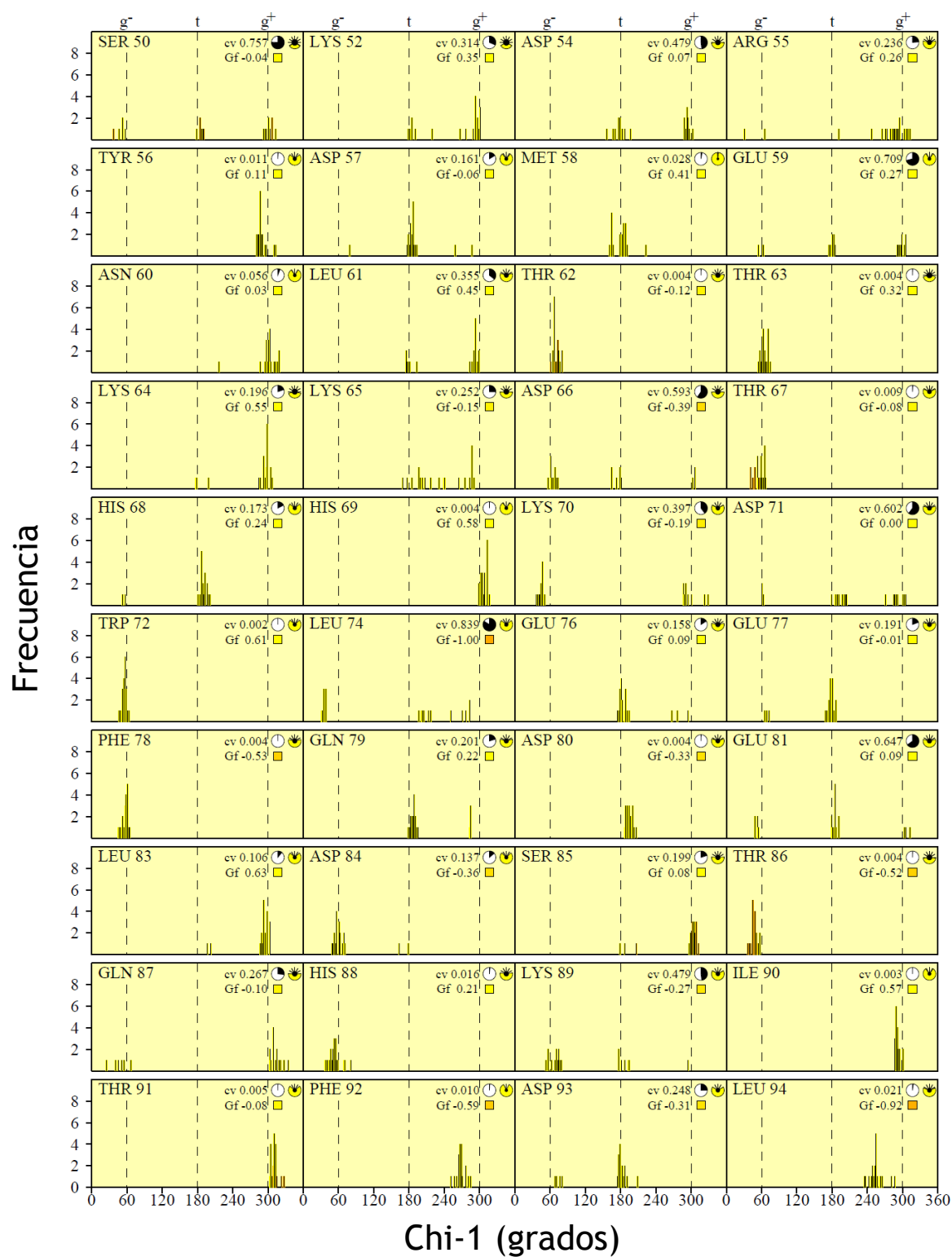
Data points coloured according to G-factor:

Favourable

Unfavourable

Distribución de Frecuencia Chi-1 (20 modelos)





cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points).

☀ Accessible

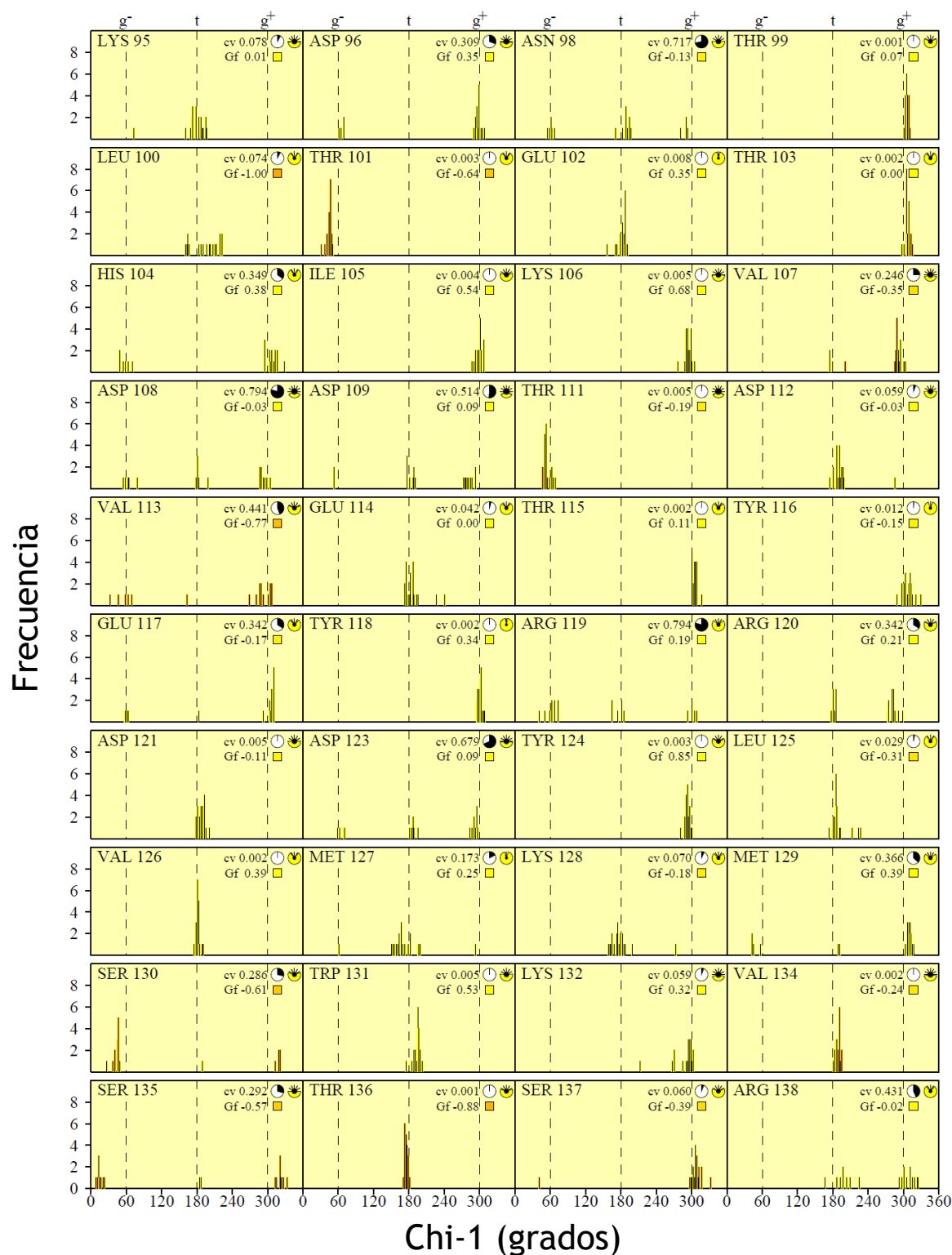
🌙 Buried

Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformations) based on analysis of high-res. Xstal structures

Data bars coloured according to G-factor:

Favourable

Unfavourable



cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points).

★ Accessible

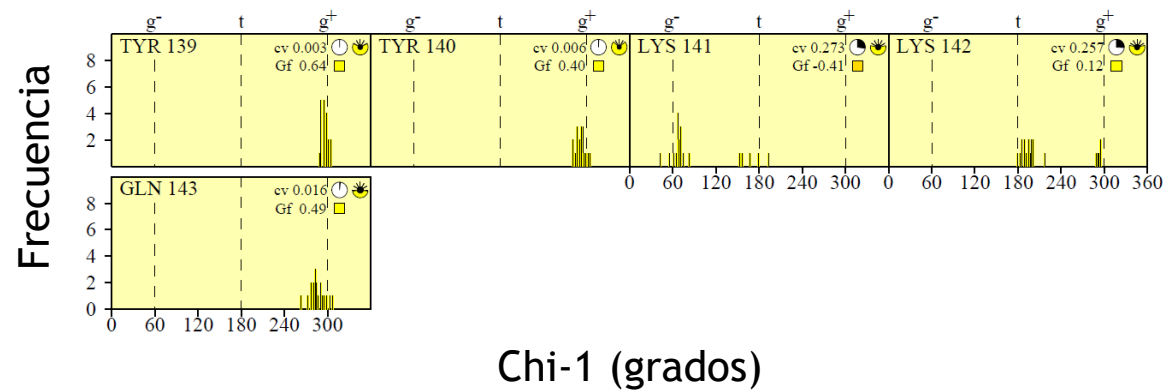
● Buried

Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformations) based on analysis of high-res. Xstal structures

Data bars coloured according to G-factor:

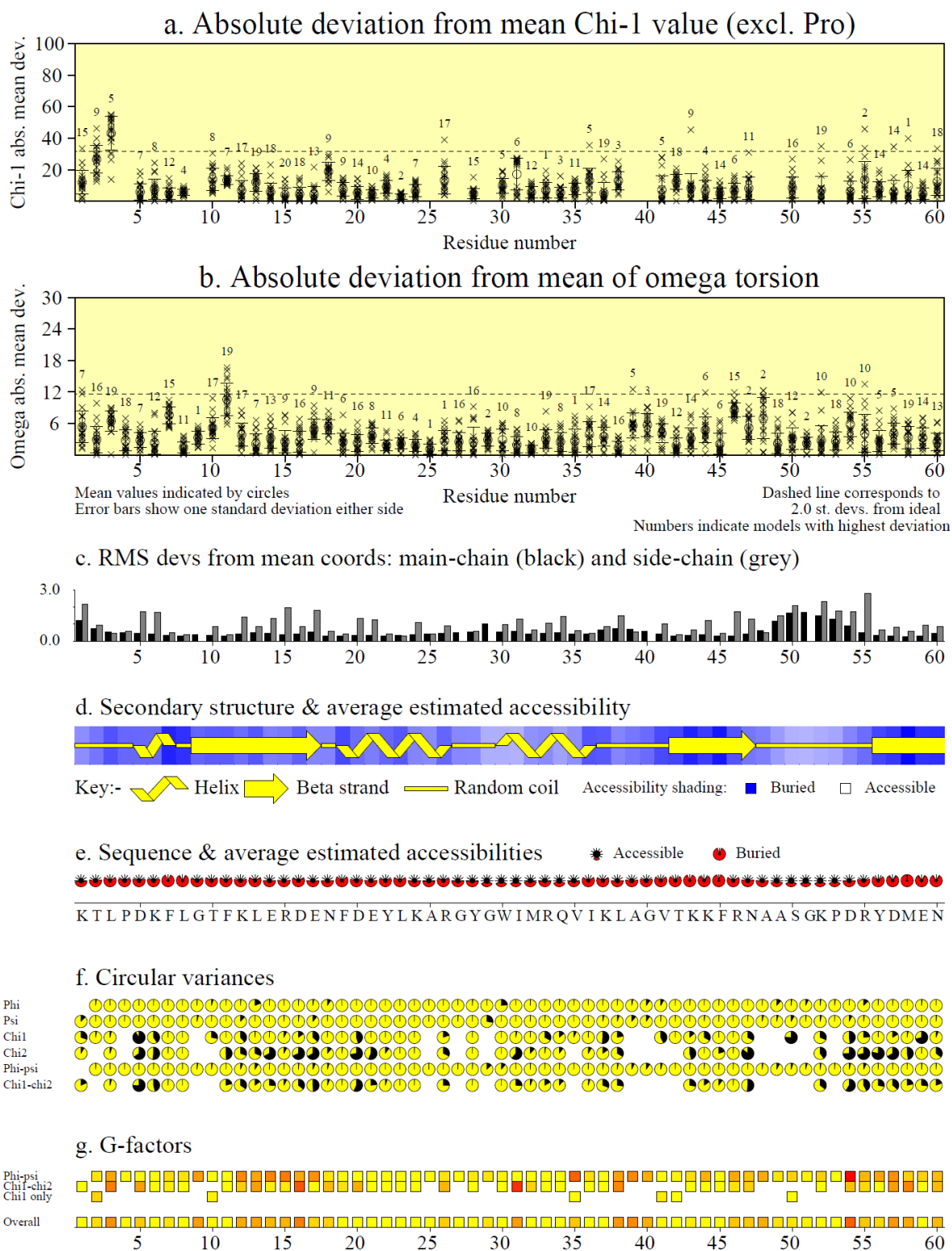
Favourable

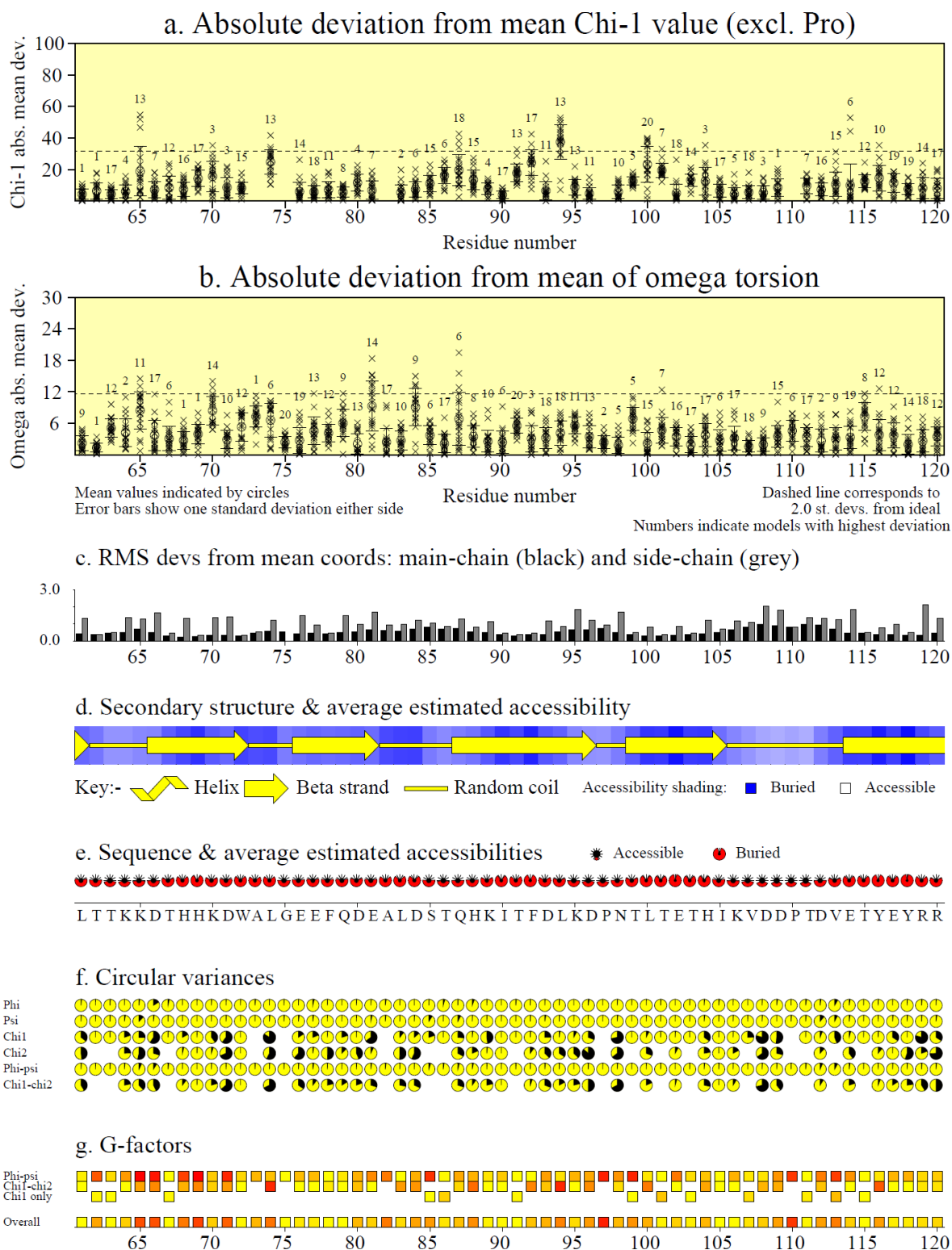
Unfavourable

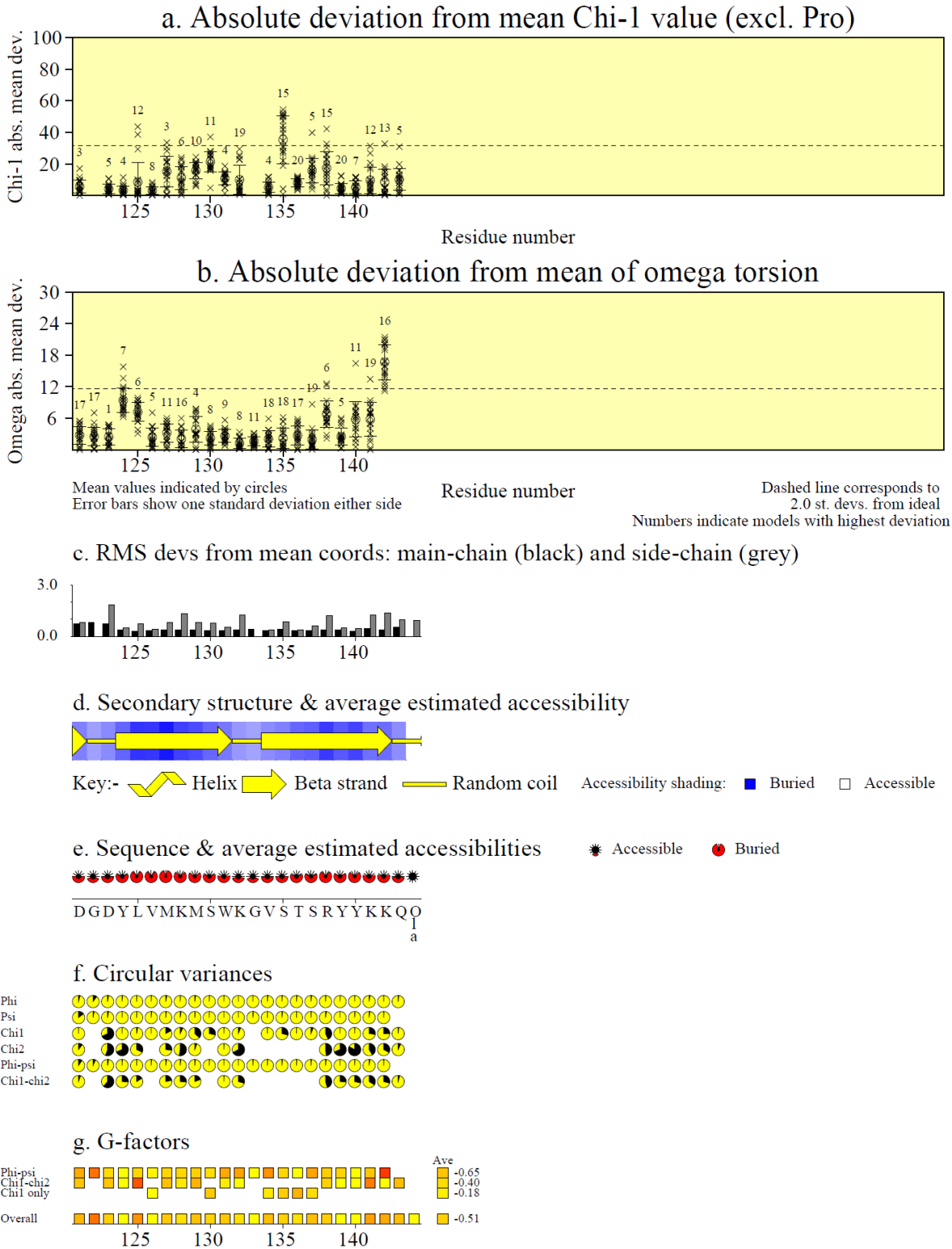


cv = Circular Variance (low values signify high clustering of the data points). * Accessible * Buried
Gf = Average G-factor for the residue (the higher the value the more favourable the conformations) based on analysis of high-res. Xstal structures
Data bars coloured according to G-factor: Favourable Unfavourable

Propiedades por Residuo (20 modelos)







Apéndice F – Parámetros Optimizados de acuerdo a *ModelFree* para el Análisis de la Dinámica del *Backbone*

Resi	Modelo	S^2/S_s^2	ΔS^2	S_f^2	ΔS_f^2	$\tau_e(\text{ps})$	$\Delta\tau_e$	$R_{ex} (\text{s}^{-1})$	ΔR_{ex}	SSE
1	5	0.625	0.010	0.833	0.008	1145.7	22.8			0.000
2	5	0.869	0.006	0.901	0.005	1037.5	46.7			0.000
5	3	0.884	0.008					2.415	0.170	0.499
6	1	0.996	0.017							1.950
7	3	0.896	0.006					3.084	0.246	0.200
8	1	0.903	0.004							10.823
9	1	0.927	0.012							4.847
10	1	0.947	0.006							3.621
11	1	0.955	0.008							3.339
12	1	0.951	0.010							3.034
14	3	0.942	0.017					1.244	0.508	0.076
17	4	0.867	0.013			20.1	5.3	2.227	0.400	0.000
19	1	1.000	0.007							3.247
20	2	0.940	0.021			44.5	17.9			0.016
21	5	0.953	0.010	0.922	0.01	2705.2	432.9			0.000
22	1	1.000	0.012							1.286
24	1	1.000	0.008							0.144
26	1	0.965	0.007							2.106
28	1	0.946	0.007							12.739
29	1	0.921	0.014							1.621
31	1	0.947	0.019							3.595
32	1	0.947	0.010							4.176
34	1	0.958	0.008							9.663
35	2	0.925	0.010			40.7	9.7			2.893
36	1	0.982	0.013							13.259
37	3	0.934	0.016					1.296	0.414	0.568
38	1	0.960	0.013							1.616
39	1	0.962	0.005							4.665
40	1	0.984	0.017							0.941
41	1	0.929	0.012							3.677
42	1	0.950	0.007							4.969
43	1	0.946	0.009							0.152
44	2	0.927	0.009			38.6	8.2			0.795
45	2	0.931	0.008			27.0	4.1			2.331
47	1	0.946	0.008							2.662
48	1	0.988	0.008							3.638
50	1	0.957	0.004							6.420
51	3	0.918	0.007					3.042	0.886	0.152
55	2	0.910	0.006			18.1	4.8			0.495
58	2	0.956	0.008			39.4	7.8			0.647
59	1	0.962	0.017							0.362
60	1	0.941	0.009							1.411
61	1	0.948	0.005							0.337
63	1	1.000	0.009							12.486
64	2	0.918	0.018			1126.6	250.0			0.006
65	5	0.908	0.010	0.837	0.009	856.5	112.3			0.000
66	2	0.924	0.012			21.3	5.4			1.914
67	1	0.946	0.009							4.038
68	1	0.968	0.018							3.999
70	1	0.899	0.007							3.524
71	3	0.969	0.006					1.485	0.474	0.652

Resi	Modelo	S^2/S_s^2	ΔS^2	S_f^2	ΔS_f^2	$\tau_e(\text{ps})$	$\Delta\tau_e$	$R_{\text{ex}}(\text{s}^{-1})$	ΔR_{ex}	SSE
72	1	1.000	0.009							16.129
73	1	0.964	0.008							1.028
74	4	0.919	0.010			22.9	3.1	1.353	0.321	0.000
76	1	0.987	0.007							13.930
77	1	0.933	0.008							2.283
78	1	0.994	0.005							4.905
79	3	0.866	0.009					1.336	0.278	0.002
80	1	0.988	0.008							4.243
81	1	0.916	0.010							3.647
82	1	0.995	0.014							6.161
83	1	0.984	0.018							6.247
84	4	0.893	0.011			28.0	4.1	1.813	0.330	0.000
85	1	0.980	0.016							0.685
87	1	0.896	0.009							3.985
88	1	0.973	0.015							0.259
89	3	0.909	0.015					1.148	0.227	0.015
90	1	0.925	0.004							1.547
92	1	0.972	0.020							0.749
93	3	0.866	0.005					3.184	0.250	0.049
96	5	0.934	0.011	0.891	0.011	1853.7	230.3			0.000
98	5	0.940	0.012	0.952	0.012	904.3	197.5			0.000
99	3	0.872	0.009					2.294	0.208	0.138
100	1	0.936	0.014							5.910
101	4	0.875	0.006			19.4	3.2	3.095	0.246	0.000
102	3	0.915	0.006					2.037	0.348	2.386
103	3	0.873	0.014					2.791	0.286	0.962
104	2	0.923	0.012			21.2	5.8			0.670
105	1	0.913	0.002							1.566
106	1	0.965	0.009							3.253
107	1	0.936	0.013							15.988
109	3	0.865	0.008			13.2	3.9			1.943
112	1	0.942	0.008							6.947
113	2	0.900	0.007			10.1	3.8			0.605
114	1	0.953	0.008							2.843
115	1	0.939	0.009							12.562
116	1	0.937	0.010							0.227
118	3	0.851	0.010					2.613	0.423	0.605
119	3	0.877	0.011					2.013	0.297	2.024
120	4	0.851	0.010			13.3	5.3	2.041	0.233	0.000
121	1	0.948	0.006							1.389
125	3	0.919	0.010					0.954	0.293	1.822
126	3	0.879	0.009					2.762	0.294	0.022
128	3	0.855	0.006					2.687	0.201	0.730
129	1	0.960	0.040							2.128
130	2	0.890	0.009			27.8	5.6			1.917
131	1	0.943	0.006							12.508
132	3	0.891	0.011					1.948	0.240	0.097
133	2	0.882	0.010			37.7	5.1			0.136
134	1	0.960	0.006							14.012
136	4	0.886	0.010			17.5	4.7	2.51	0.360	0.000
140	3	0.925	0.017					2.302	0.723	0.002
142	1	1.000	0.023							4.071

Apéndice G – Efecto de la Inclusión de Restricciones RDC y Puente de Hidrógeno en el Refinamiento de la Estructura de As-p18

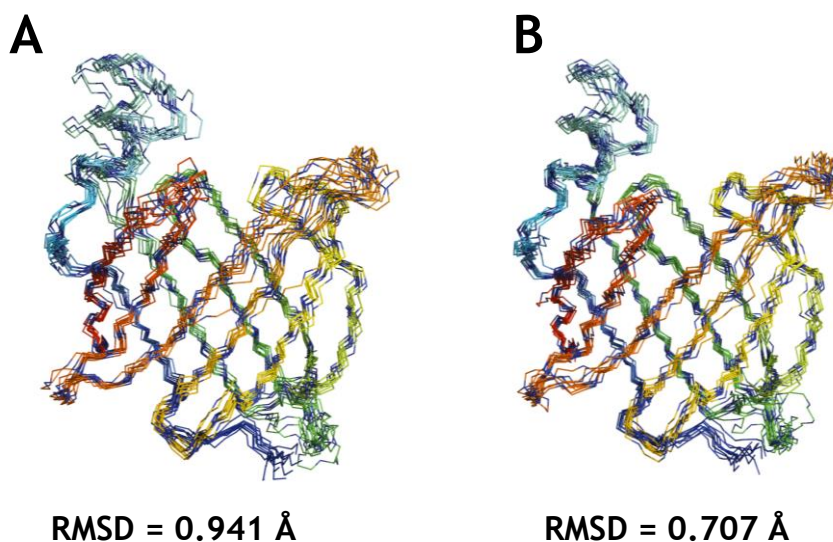


Figura G.1. Efecto de la inclusión de restricciones RDCs y de puente de hidrógeno en las etapas de refinamiento de la estructura de As-p18. Se muestran los trazos del esqueleto aminoacídico de diez conformaciones de As-p18, antes (A) y después (B) de la incorporación de las restricciones $^1D_{NH}$ y de puente de hidrógeno, con sus respectivos valores de RMSD.

Apéndice H – Preparación y Cuantificación de SUVs

Preparación

Se prepararon vesículas unilamelares pequeñas de acuerdo a los trabajos de Huang & Thompson, 1974 y Storch & Kleinfeld, 1986. Los lípidos en CHCl_3 fueron mezclados, secados bajo corriente de N_2 y resuspendidos en buffer TBS. La mezcla de fosfolípidos se incubó a 37 °C hasta lograr una resuspensión total. Seguidamente se sonicó a 4 °C bajo atmósfera de N_2 gaseado hasta clarificar la suspensión (aproximadamente 45 min). Las vesículas se separaron por ultracentrifugación a 50000 g durante 45 min a 4 °C y se conservaron sólo las SUV del sobrenadante en una atmósfera de N_2 . En particular para la preparación de vesículas zwitteriónicas se empleó una composición de 90 mol % fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 10 mol % N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) fosfatidilcolina (NBD-PC) (*Avanti Polar Lipids*). Este último compuesto actúa como *quencher* de la fluorescencia de los antroiloxiderivados de ácidos grasos (AOFA).

Cuantificación

La concentración de las SUV obtenidas se calculó en base al ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico descrito por Gomori (1942) y Ames & Dubin (1960). La curva de calibración se preparó empleando como estándar NaH_2PO_4 1 mM en los siguientes volúmenes: 0 (para el blanco), 2, 5, 10, 20 y 40 μL . Las muestras y los estándares se prepararon por duplicado. A cada uno de los tubos se le agregaron 30 μL de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 10 % en etanol y se carbonizó bajo llama hasta observarse las cenizas blancas en el fondo del tubo. Luego de dejar enfriar, se agregaron 400 μL de HCl 0.5 N agitando en *vortex*. Posteriormente, los tubos correctamente tapados, se incubaron por 30 min en baño de agua hirviendo. Finalizada la incubación, se agregó a cada tubo 930 μL de una solución 1:6 (v/v) de ácido ascórbico 10% (p/v): ácido molíbdico (0.42 % molibdato de amonio·4 H_2O en H_2SO_4 1 N). Las muestras se incubaron nuevamente durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 820 nm.

Bibliografía

Ames BN, Dubin DT. (1960) The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 235:769-75.

Gomori G. (1942) A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J Lab Clin Med* 27, 955–960.

Huang C, Thompson TE. (1974) Preparation of homogeneous, single - walled phosphatidylcholine vesicles. *Method Enzym* 32, 485–489.

Storch J, Kleinfeld AM. (1986) Transfer of long - chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 25, 1717–1726.

Apéndice I – Ov-FAB-1. Biología Molecular y Puesta a Punto de la Purificación

Se recibió el clon de ADNc codificante para la proteína Ov-FAB-1 del parásito *Onchocerca volvulus* (GenBank BF727540, clone SWOv3MCAM50G01SK) en el vector fago Lambda Uni-ZAP XR provisto por el NIAID/NIH Filariasis Research Reagent Resource Center.

Primeramente, se amplificó el clon mediante la infección de los fagos a células XL-1Blue MRF', tal como se describe en <http://www.nematodes.org/research/nematodes/fgn/methods/phage.html>. A partir de la solución de fagos amplificados se procedió a levantar la secuencia de interés empleando los *primers* adecuados, siguiendo el protocolo de PCR detallado en http://www.nematodes.org/research/nematodes/fgn/methods/PCR_PROTOCOL.html. Los productos de amplificación se insertaron en el vector pGEMT easy según el protocolo del fabricante (*Promega*). Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* XL-1Blue competentes preparadas según Sambrook et al., 1989 con el producto de ligación vector–fragmento de PCR. Se seleccionaron como colonias positivas portadoras del inserto a aquellas que crecieron en LBagar/Ampicilina/X-Gal/IPTG, y que presentaron color blanco sobre aquellas que presentaron color azul. El siguiente paso consistió en el pasaje de la secuencia codificante al vector de expresión pET28b (con cola de histidina en extremo N-terminal); y transformación en bacterias competentes *E. coli* DH5α (*Novagen*). Luego se corroboró la identidad de la secuencia sub-clonada por secuenciación (*DNA Sequencing & Services - University of Dundee, Scotland*). Para la obtención de la proteína se transformó a la cepa *E. coli* Tuner (D3) *competent cells* (*Novagen*) con la construcción mencionada y se realizaron los ensayos de expresión. Se encontró que la proteína formaba cuerpos de inclusión por lo que no podía recuperarse como parte soluble luego del fraccionamiento del lisado bacteriano. Teniendo en cuenta que los cuerpos de inclusión podrían formarse por una alta velocidad de síntesis que impediría el correcto plegamiento de las proteínas, se ensayaron distintas condiciones de temperatura de cultivo y de inducción, tendientes a moderar la velocidad de síntesis proteica. Sin embargo, en todas las combinaciones probadas (Temperaturas [°C]: 20 y 37, concentraciones de IPTG [mM]: 0.05; 0.10; 0.40) la proteína se encontró en la fracción insoluble luego de la centrifugación del lisado celular. Como alternativa, se intentó purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad con níquel (*Novagen*), bajo

condiciones desnaturalizantes; con distintas concentraciones de urea ([M]: 0.5; 1; 2; 4; 6 y 8) para liberarla de los cuerpos de inclusión. Por un lado se ensayó la elución de proteína renaturalizada desde las columnas de afinidad, disminuyendo en forma progresiva la concentración de urea. Por otro, se intentó recuperar proteína renaturalizada mediante un método de hiperdilución que emplea un buffer de plegamiento como se indica en McDermott et al., 2006. Ambas estrategias mostraron ser infructuosas ya que se demostró posteriormente que la proteína recuperada no estaba correctamente plegada, al realizarse estudios de control funcional por fluorescencia y estructural por dicroísmo circular (Figura G.1). Una tercera estrategia consistió en solubilizar Ov-FAB-1 desde los cuerpos de inclusión empleando solventes orgánicos para luego recuperarla mediante HPLC de fase reversa. Se utilizaron soluciones de Acetonitrilo/Agua/Ácido Trifluoroacético (TFA) y una columna de RP-HPLC C₈. Sin embargo, en el posterior paso de liofilizado y resuspensión, la proteína mostró signos de agregación, aún cuando se modificaran diversas variables en el protocolo seguido.

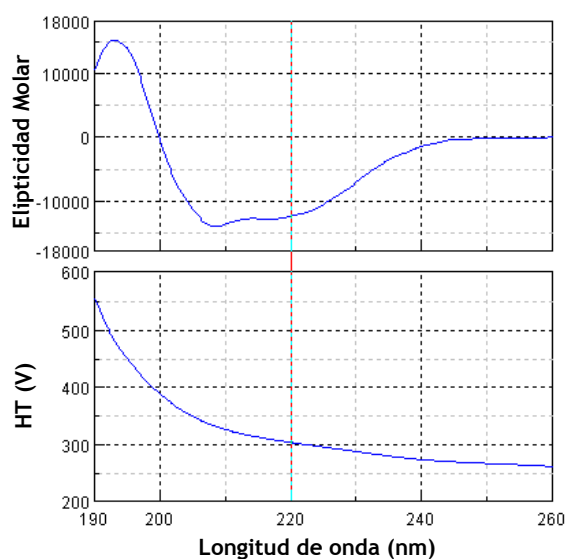


Figura I.1. Espectro de CD (UV lejano) de Ov-FAB-1 luego del intento de renaturalización. El porcentaje promedio de hoja β calculado por algoritmos fue de alrededor del 15%, contrastando con la predicción de estructura FABP (valores entre 35 y 59%).

Por último, se recurrió a la coexpresión de Ov-FAB-1 con un sistema de chaperonas en paralelo el cual puede asistir en el plegamiento de la proteína, mejorando su recuperación desde la fracción soluble (Thomas et al., 1997; Nishihara et al., 2000). Se cotransformaron *E. coli* Tuner (D3) competent cells (Novagen) con el plásmido

pET28b[Ov-FAB-1] y el plásmido pGTf2 (*Takara*), el cual codifica para las chaperonas GroES, GroEL y para el Trigger Factor bajo el promotor Pzt1 inducible por tetraciclina. Las bacterias doblemente seleccionadas para ambos plásmidos, se emplearon en ensayos de expresión variando condiciones de inducción y temperatura. Como se muestra en la Figura G.2, con un cultivo crecido a 20 °C, la proteína continuó recuperándose desde la fracción insoluble. La identidad de la banda se comprobó, por su ubicación respecto al marcador molecular así como mediante un *Western Blot* empleando anticuerpos anti-poliHistidina (*Invitrogen*).

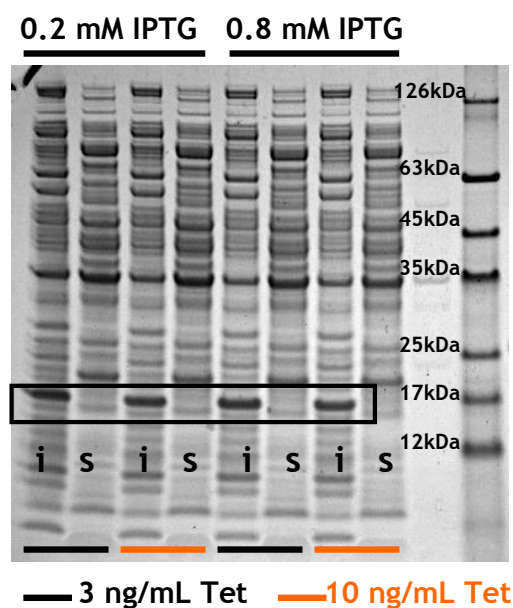


Figura I.2. Screening de expresión Ov-FAB-1 con el sistema de chaperonas GroES-GroEL-tig. Se muestran distintas condiciones de inducción. *i*: Fracción Insoluble; *s*: Fracción Soluble. Se recuadran las bandas de Ov-FAB-1 en la fracción insoluble.

En este punto de la investigación, los ensayos para la otra proteína, As-p18, que se conducían en paralelo, ya se encontraban mucho más avanzados. Hallándose el estudio de la proteína As-p18 en la etapa de ensayos de Resonancia Magnética Nuclear, se decidió enfocarse en esta última, discontinuando los intentos de purificación de Ov-FAB-1.

Bibliografía

McDermott LC, Freel JA, West AP, Bjorkman PJ, Kennedy MW. (2006) Zn-alpha2-glycoprotein, an MHC class I-related glycoprotein regulator of adipose tissues: modification or abrogation of ligand binding

by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 21;45(7):2035-41.

Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. (2000) Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66:884-889.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. (1997) Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl Biochem Biotech* 66:197-238.

Apéndice J – Bm-FAB-1. Biología Molecular, Purificación y Estudios Preliminares de NMR

Se recibió el plásmido pProEx con la secuencia codificante para la proteína Bm-FAB-1 del parásito *Brugia malayi* (GenBank Accession Number AF178439) provisto por la Dra. Michelle L. Michalski (University of Wisconsin, Oshkosh). Dicho vector cuenta con un *cassette* de resistencia a ampicilina y la secuencia de la proteína se encuentra precedida por una etiqueta de polihistidinas para su posterior purificación por afinidad. Se realizó la transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5 α (Novagen). Luego se corroboró la presencia del inserto (550 pb) mediante digestión de *minipreps* con las enzimas de restricción NcoI y XhoI y electroforesis en geles de agarosa de acuerdo a Michalski et al., 2002. Para la obtención de la proteína se transformó a la cepa *E. coli* Tuner (D3) *competent cells* (Novagen) y se realizaron los ensayos de expresión. Habiendo encontrado condiciones de expresión adecuadas (37 °C, 1 mM IPTG) y corroborado que el espectro 1D ^1H RMN correspondiente mostrara señales agudas y bien dispersas (indicativos de la factibilidad del estudio por RMN), se emprendió la purificación en medio enriquecido con ^{15}N -NH $_4\text{Cl}$. El protocolo de purificación para los estudios preliminares incluyeron las etapas de cromatografía de afinidad por níquel y de exclusión molecular solamente. Los procedimientos se desarrollaron de forma similar a los descritos para la proteína As-p18 en el Capítulo 3. Tal como revela la Figura J.1, la purificación de Bm-FAB-1 resultó satisfactoria.

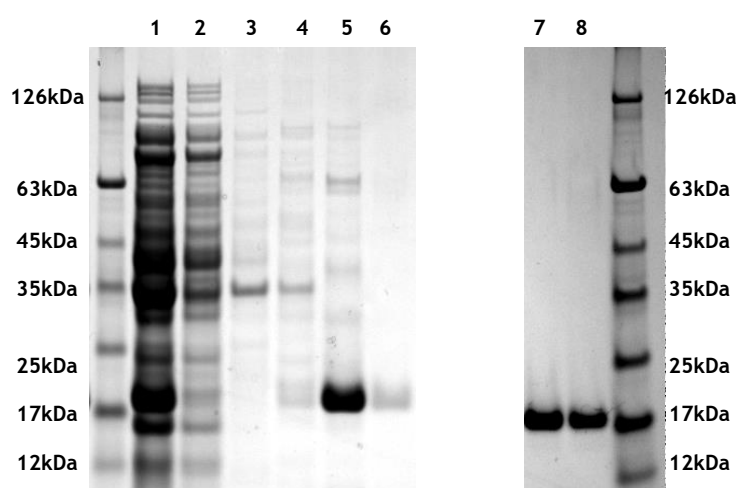


Figura J.1. SDS-PAGE de fracciones de cromatografía de afinidad y exclusión molecular en la purificación de Bm-FAB-1. Calle 1: fracción soluble luego de la lisis celular. Calle 2: fracción proteica que no se une a la columna de afinidad. Calle 3 y 4: fracciones de proteínas eluidas con solución de lavado 25 mM imidazol. Calle 5 y 6: fracciones eluidas con 250 mM de imidazol. Calles 7 y 8: fracciones colectadas de la columna de exclusión molecular.

La proteína purificada, no deslipidizada proveniente de un cultivo bacteriano de 500 mL de medio M9 complementado con ^{15}N - NH_4Cl se concentró hasta $\sim 570\ \mu\text{L}$. Luego de adicionar $30\ \mu\text{L}$ de D_2O se adquirió un espectro ^{15}N -HSQC (Figura J.2).

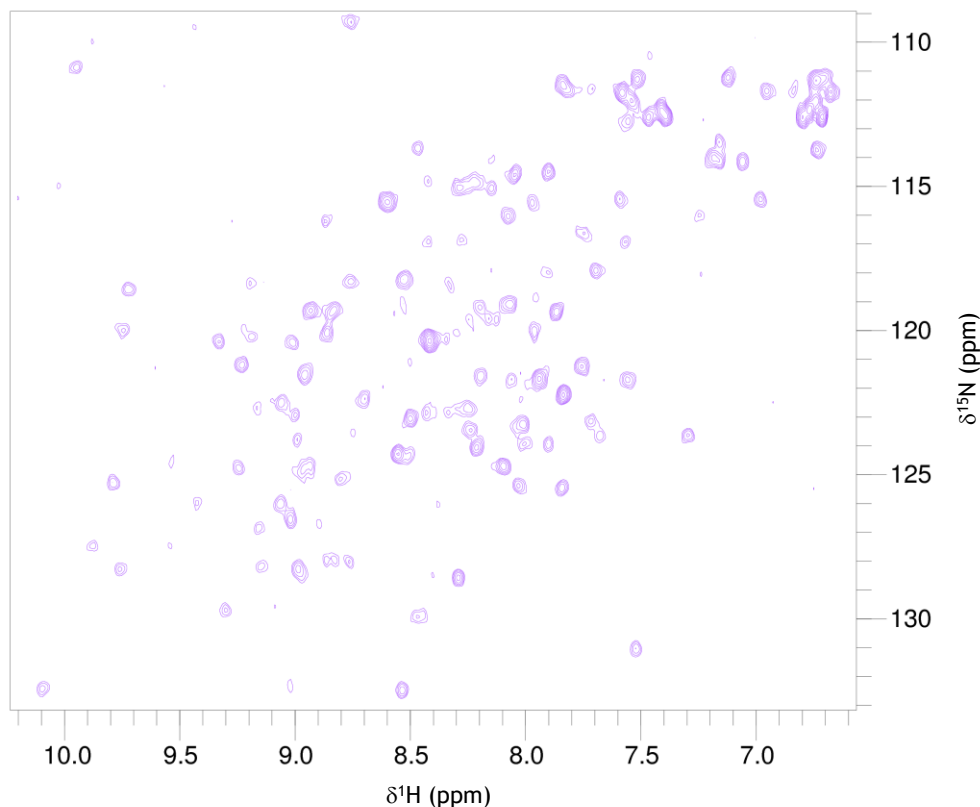


Figura J.2. Espectro bidimensional ^1H - ^{15}N HSQC de Bm-FAB-1 recombinante. El experimento se llevó a cabo en buffer de composición 1 mM NaPi, 7.5 mM NaCl, pH=7.4 y a una temperatura de 301.1 K.

Dadas las cualidades del espectro obtenido, el cual exhibe señales definidas y dispersas, puede concluirse que la proteína Bm-FAB-1 cumple los requisitos para ser estudiada por RMN.

Bibliografía

Michalski ML, Monsey JD, Cistola DP, Weil GJ. (2002) An embryo-associated fatty acid-binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*. Mol Biochem Parasitol 124(1-2):1-10.

Apéndice K –Secuencias de Proteínas Empleadas en el Alineamiento Múltiple por *MUSCLE*

Nombre	Código Proteína	Organismo	Fuente
MFB2	P31417	<i>Manduca sexta</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P31417
Hs-LFABP	P07148	<i>Homo sapiens</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P07148
Ss-ILBP	P10289	<i>Sus scrofa</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P10289
Gg-LbFABP	P80226	<i>Gallus gallus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P80226
Rn-IBABP	P80020	<i>Rattus norvegicus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P80020
Hs-IFABP	P12104	<i>Homo sapiens</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P12104
Rn-IFABP	P02693	<i>Rattus norvegicus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P02693
Rn-CRBPI	P02696	<i>Rattus norvegicus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P02696
Mm-CRABPI	P62965	<i>Mus musculus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P62965
Xl-CRABPII	P50568.2	<i>Xenopus laevis</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P50568.2
Ts-MFABP2	HQ259680/GB: ADZ72849.1	<i>Taenia solium</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HQ259680
Eg-FABP1	Q02970	<i>Echinococcus granulosus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/Q02970
Ts-MFABP1	HQ259679/GB: ADZ72848.1	<i>Taenia solium</i>	www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HQ259679
Lm-MFABP	P41509	<i>Locusta migratoria</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P41509
Mm-AFABP	P04117	<i>Mus musculus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P04117
Bt-HFABP	P10790	<i>Bos Taurus</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P10790
Sm14	P29498	<i>Schistosoma mansoni</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/P29498
Fh15	UniProtKB/Swiss-Prot: Q7M4G0.3	<i>Fasciola hepatica</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/47115698
Ce-LBP1	Q20223	<i>Caenorhabditis elegans</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/Q20223
Ce-LBP2	Q20224	<i>Caenorhabditis elegans</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/Q20224
Ce-LBP3	Q27GU2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	http://www.uniprot.org/uniprot/Q27GU2
As-p18	GB: AAA98565.1	<i>Ascaris suum</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA98565.1
Bm-FAB1	GB: AF178439	<i>Brugia malayi</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/AF178439
Ov-FAB1	GB: BF727540, clon SWOV3MCAM50G01SK	<i>Onchocerca volvulus</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/BF727540

El código de colores de las secuencias se presenta de acuerdo al dendrograma de la Figura 1.8.